

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



## **TESIS DOCTORAL**

### **Nanoencapsulación de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas procedentes de subproductos de la pesca**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Mauricio Esteban Mosquera Jordán**

Directores

M<sup>a</sup>. Carmen Gómez Guillén

M<sup>a</sup>. Pilar Montero García

Begoña Giménez Castillo

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**NANOENCAPSULACIÓN DE HIDROLIZADOS  
PEPTÍDICOS CON ACTIVIDADES BIOLÓGICAS  
PROCEDENTES DE SUBPRODUCTOS DE LA PESCA**

**Mauricio Esteban Mosquera Jordán**

**Madrid, 2013**





**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Departamento de Nutrición,  
Bromatología y Tecnología de  
los Alimentos

Instituto de Ciencia y  
Tecnología de Alimentos y Nutrición  
Consejo superior de Investigaciones Científicas

**NANOENCAPSULACIÓN DE HIDROLIZADOS PEPTÍDICOS CON ACTIVIDADES  
BIOLÓGICAS PROCEDENTES DE SUBPRODUCTOS DE LA PESCA**

Memoria que presenta Mauricio Esteban Mosquera Jordán para optar al grado de Doctor por la  
Universidad Complutense de Madrid

Bajo la dirección de la Dra. M. Carmen Gómez Guillén, la Dra. M Pilar Montero García y la Dra.  
Begoña Giménez Castillo

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS (CSIC)

Madrid, 2013



**ESTA TESIS DOCTORAL HA SIDO REALIZADA GRACIAS A LA FINANCIACIÓN DE DIFERENTES AYUDAS Y PROYECTOS:**

Ayuda para la formación de Investigadores del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, programa “Junta para la Ampliación de Estudios” (JAE-Predoc)

Obtención de hidrolizados y péptidos con propiedades bioactivas a partir de residuos de la pesca (Peptivida). **AGL2008-02135/ALI** IP: Pilar Montero. Plan Nacional I+D

Recuperación de compuestos funcionales a partir de residuos de crustáceos para su aplicación como material filmogénico y bioactivo. Crustaval-. **Proyecto AGL2011-27607**. IP: Dra. M. Carmen Gómez Guillén

Ayuda para estancia breve en el extranjero para beneficiarios de ayudas JAE-Predoc en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA) de la Universidad Federal de Río Grande del Sur (UFRGS). Brasil (junio-diciembre de 2012).



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1. Situación actual de la pesca y la acuicultura</b> .....	<b>15</b>
1.1.1 Residuos generados por la industria pesquera .....	15
1.1.2 Especies utilizadas en el presente estudio .....	16
1.1.2.1 Calamar gigante ( <i>Dosidicus gigas</i> ) .....	16
1.1.2.2 Dorada ( <i>Sparus aurata</i> ) .....	20
1.1.2.3 Langostino ( <i>Penaeus notialis</i> ) .....	23
<b>1.2. Colágeno</b> .....	<b>26</b>
1.2.1 Colágeno Tipo I .....	26
1.2.2 Gelatina .....	27
1.2.2.1 Gelatina procedente de subproductos de la pesca .....	29
1.2.3 Hidrolizados peptídicos a partir de colágeno y gelatina .....	30
<b>1.3. Hidrólisis enzimática</b> .....	<b>32</b>
<b>1.4. Actividades biológicas de los péptidos</b> .....	<b>36</b>
1.4.1 Actividad antihipertensiva .....	37
1.4.2 Actividad antioxidante .....	39
1.4.3 Actividad hipoglucemiante .....	40
1.4.4 Actividad antimicrobiana .....	43
<b>1.5. Nanoencapsulación de compuestos bioactivos en liposomas</b> .....	<b>44</b>
1.5.1 Caracterización de nanoliposomas .....	46
1.5.1.1 Tamaño y polidispersidad de los liposomas .....	46
1.5.1.2 Eficiencia de encapsulación .....	47
1.5.1.3 Potencial zeta .....	50
1.5.2 Aplicaciones de los nanoliposomas en la industria alimentaria .....	51
<b>1.6. Películas comestibles como alimento funcional</b> .....	<b>53</b>
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>55</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>59</b>
<b>4. DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>63</b>



<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>67</b>
<b>5.1. Preparación de las muestras</b>	<b>69</b>
5.1.1. Túnica de Calamar	69
5.1.2. Espinas y escamas de Dorada	70
5.1.3. Desmineralización de las escamas	70
5.1.4. Langostinos enteros	70
<b>5.2. Gelatinas</b>	<b>71</b>
5.2.1. Extracción de Gelatina de espinas y escamas de Dorada	71
5.2.2. Propiedades gelificantes	71
5.2.2.1. Propiedades viscoelásticas	72
5.2.2.2. Fuerza del gel	72
<b>5.3. Hidrólisis enzimática</b>	<b>74</b>
5.3.1. Hidrólisis de túnica de calamar	74
5.3.2. Hidrólisis de gelatina y escamas desmineralizadas de dorada	75
5.3.3. Hidrólisis de langostinos	75
<b>5.4. Fraccionamiento</b>	<b>75</b>
5.4.1. Determinación del tamaño molecular de hidrolizados y fracciones peptídicas	76
<b>5.5. Propiedades bioactivas de los hidrolizados</b>	<b>77</b>
5.5.1. Determinación de la actividad antioxidante	77
5.5.2. Determinación de la actividad antihipertensiva	77
5.5.3. Determinación de la actividad antimicrobiana	78
5.5.4. Determinación de la actividad hipoglucemiante	79
<b>5.6. Composición química</b>	<b>81</b>
5.6.1. Humedad y cenizas	81
5.6.2. Minerales	81
5.6.3. Proteínas	81
5.6.4. Composición de aminoácidos	81
<b>5.7. Encapsulación en nanoliposomas de fosfatidilcolina</b>	<b>82</b>
5.7.1. Purificación de fosfatidilcolina a partir de lecitina cruda de soja	82
5.7.2. Producción de liposomas por el método de hidratación de la película	82
5.7.3. Producción de liposomas por el método de calentamiento	83
5.7.4. Caracterización de los liposomas	83
5.7.5. Eficiencia de encapsulación	84
5.7.6. Estabilidad de los liposomas a diferentes pH	84
5.7.7. Incorporación de liposomas en gel de gelatina	84

5.7.7.1.	Caracterización de los geles de gelatina .....	85
5.7.8.	Incorporación de liposomas en películas de caseinato sódico .....	85
5.7.8.1.	Caracterización de las películas .....	85
5.7.9.	Análisis de la morfología de los liposomas .....	86
5.7.9.1.	Preparación de los liposomas para el análisis .....	86
5.7.9.2.	Preparación de las películas para el análisis .....	87
<b>5.8.</b>	<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>88</b>
<b>6.</b>	<b>TRABAJO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>89</b>
<b>6.1.</b>	<b>Espinas y escamas de dorada (<i>Sparus aurata</i>) como fuente de gelatina y de péptidos con actividad antihipertensiva .....</b>	<b>91</b>
6.1.1.	Resumen .....	93
6.1.2.	Introducción .....	94
6.1.3.	Objetivo .....	96
6.1.4.	Metodología experimental .....	97
6.1.5.	Resultados y discusión .....	98
6.1.5.1.	Gelatinas .....	98
6.1.5.1.1.	Extracción de gelatina .....	98
6.1.5.1.2.	Caracterización de la gelatina .....	98
6.1.5.1.3.	Composición de aminoácidos .....	100
6.1.5.1.4.	Fuerza del gel .....	102
6.1.5.1.5.	Propiedades viscoelásticas.....	103
6.1.5.2.	Hidrolizados de gelatina de escamas .....	107
6.1.5.2.1.	Hidrólisis y fraccionamiento del hidrolizado .....	107
6.1.5.2.2.	Actividad antihipertensiva del hidrolizado de gelatina de escamas .....	108
6.1.6.	Conclusión .....	109
6.1.7.	Bibliografía.....	110
<b>6.2.</b>	<b>Fracciones peptídicas obtenidas a partir de túnica de calamar gigante con actividades antioxidante, antihipertensiva y antimicrobiana.....</b>	<b>115</b>
6.2.1.	Resumen .....	117
6.2.2.	Introducción .....	118
6.2.3.	Objetivo .....	120
6.2.4.	Metodología experimental .....	121
6.2.5.	Resultados y discusión.....	123
6.2.5.1.	Distribución de pesos moleculares .....	123
6.2.5.2.	Actividad antioxidante de los hidrolizados .....	125
6.2.5.3.	Actividad antioxidante de las fracciones peptídicas. ....	126

6.2.5.4.	Relación entre la composición de aminoácidos y la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas.....	127
6.2.5.5.	Actividad antihipertensiva de las fracciones peptídicas .....	129
6.2.5.6.	Actividad antimicrobiana de las fracciones peptídicas .....	131
6.2.6.	Conclusión .....	134
6.2.7.	Bibliografía.....	135
<b>6.3.</b>	<b>Nanoencapsulación de fracciones peptídicas activas procedentes de escamas de Dorada (<i>Sparus aurata</i>) .....</b>	<b>139</b>
6.3.1.	Resumen .....	141
6.3.2.	Introducción .....	142
6.3.3.	Objetivo .....	144
6.3.4.	Metodología experimental .....	145
6.3.5.	Resultados y discusión .....	147
6.3.5.1.	Contenido de proteínas y cenizas de las escamas desmineralizadas.....	147
6.3.5.2.	Composición de aminoácidos de la fracción peptídica .....	147
6.3.5.3.	Optimización de la encapsulación de la fracción <3 kDa (F3) .....	148
6.3.5.4.	Caracterización del producto optimizado .....	152
6.3.5.5.	Actividades antioxidante y antihipertensiva de la fracción peptídica F3 antes y después de la encapsulación.....	154
6.3.6.	Conclusiones.....	158
6.3.7.	Bibliografía.....	159
<b>6.4.</b>	<b>Incorporación de péptidos nanoencapsulados con actividad antihipertensiva en un gel de gelatina .....</b>	<b>163</b>
6.4.1.	Resumen .....	165
6.4.2.	Introducción .....	166
6.4.3.	Objetivos.....	168
6.4.4.	Metodología experimental .....	169
6.4.5.	Resultados y discusión .....	170
6.4.5.1.	Encapsulación de la fracción peptídica .....	170
6.4.5.2.	Efecto del pH en la estabilidad de los nanoliposomas .....	174
6.4.5.3.	Incorporación de L-P1 en gelatina .....	175
6.4.5.4.	Actividad antihipertensiva .....	178
6.4.6.	Conclusiones.....	180
6.4.7.	Bibliografía.....	181
<b>6.5.</b>	<b>Películas funcionales de caseinato sódico enriquecidas con péptidos bioactivos procedentes de residuos de crustáceos encapsulados en nanovesículas .....</b>	<b>185</b>

6.5.1.	Resumen .....	187
6.5.2.	Introducción .....	188
6.5.3.	Objetivos.....	191
6.5.4.	Metodología experimental .....	192
6.5.5.	Resultados y discusión .....	194
6.5.5.1.	Composición de aminoácidos de la fracción peptídica .....	194
6.5.5.2.	Actividades biológicas de la fracción peptídica.....	195
6.5.5.3.	Nanoencapsulación de la fracción <3 kDa (ST1) .....	197
6.5.5.4.	Incorporación de L-ST1 en películas comestibles .....	201
6.5.5.5.	Liberación de los péptidos .....	205
6.5.6.	Conclusiones.....	207
6.5.7.	Bibliografía.....	208
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>215</b>
<b>7.1.</b>	<b>Obtención de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas a partir de subproductos de la pesca.....</b>	<b>217</b>
7.1.1.	Acondicionamiento de las materias primas .....	217
7.1.1.1.	Desmineralización de escamas de dorada .....	219
7.1.1.2.	Extracción de gelatina de escamas y espinas de dorada .....	220
7.1.2.	Hidrólisis enzimática .....	222
7.1.2.1.	Grado de hidrólisis .....	222
7.1.3.	Fraccionamiento .....	224
7.1.4.	Composición de aminoácidos de las fracciones peptídicas .....	226
7.1.5.	Actividades biológicas de las fracciones peptídicas.....	230
7.1.5.1.	Actividad Antioxidante mediante capacidad secuestrante de radicales libres .....	231
7.1.5.2.	Actividad antihipertensiva mediante inhibición de la ACE .....	234
7.1.5.3.	Actividad antimicrobiana .....	237
7.1.5.4.	Actividad hipoglucemiante mediante inhibición de la DPP-IV .....	241
<b>7.2.</b>	<b>Encapsulación de hidrolizados peptídicos en nanoliposomas de fosfatidilcolina</b>	<b>244</b>
7.2.1.	Tamaño y polidispersidad de los liposomas .....	245
7.2.2.	Eficiencia de encapsulación .....	247
7.2.3.	Estabilidad de los liposomas.....	248
<b>7.3.</b>	<b>Aplicaciones tecnológicas de los encapsulados .....</b>	<b>253</b>
7.3.1.	Nanoliposomas en gel de gelatina.....	253
7.3.2.	Nanoliposomas en películas comestibles de caseinato sódico .....	256
7.3.3.	Uso de los nanoliposomas en aplicaciones alimentarias con efectos potencialmente nutraceuticos. ....	258

<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>263</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>269</b>
<b>10. RESUMEN AMPLIADO / EXTENDED ABSTRACT</b>	<b>299</b>
<b>10.1. Resumen ampliado</b>	<b>301</b>
10.1.1. Introducción	301
10.1.2. Objetivos	304
10.1.3. Resultados	305
10.1.3.1. Obtención de fracciones peptídicas con actividades biológicas a partir de subproductos de la pesca	305
10.1.3.2. Encapsulación de hidrolizados peptídicos en nanoliposomas de fosfatidilcolina	307
10.1.3.3. Aplicaciones tecnológicas de los encapsulados	308
10.1.4. Conclusiones	310
10.1.5. Referencias bibliográficas	313
<b>10.2. Extended abstract</b>	<b>317</b>
10.2.1. Introduction	317
10.2.2. Objectives	319
10.2.3. Results	321
10.2.3.1. Obtaining of peptide fractions with biological activities from fish industry residues	321
10.2.3.2. Encapsulation of peptidic hydrolysates into phosphatidylcholine nanoliposomes	322
10.2.3.3. Technological applications of nanoliposomes	323
10.2.4. Conclusions	324
10.2.5. References	326

***RESUMEN***



En el presente estudio se utilizaron residuos procedentes de la industria pesquera, todos ellos ricos en material proteico: túnica de calamar gigante, espinas de dorada, escamas de dorada y langostinos enteros.

En la mayoría de los trabajos publicados para la obtención de hidrolizados peptídicos a partir de subproductos de origen pesquero ricos en colágeno, como primera etapa se procede a realizar una extracción de gelatina (colágeno desnaturalizado) para facilitar la hidrólisis enzimática posterior. Así pues, se analizaron las espinas y escamas de dorada como fuente de gelatina y el potencial de los péptidos procedentes de ésta última como inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina I (ACE). De las escamas se obtuvo un rendimiento de extracción de gelatina de 9.55%, mientras que el rendimiento de extracción de gelatina a partir de espinas fue muy inferior, por este motivo, se desestimó su estudio posterior como fuente de hidrolizados bioactivos.

Mediante hidrólisis enzimática se obtuvieron hidrolizados peptídicos a partir de túnica de calamar gigante, gelatina de escamas de dorada, escamas de dorada desmineralizadas y langostinos enteros. Estos hidrolizados fueron fraccionados mediante ultrafiltración obteniéndose fracciones de péptidos inferiores a 1 kDa en todos los casos, además en la túnica de calamar, mediante ultrafiltración tangencial y membranas de corte de 10, 3 y 1 kDa, se obtuvieron 3 fracciones peptídicas correspondientes a cada rango de filtración.

En el presente trabajo se evaluaron las actividades antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva mediante inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina-I (ACE) e hipoglucemiante mediante inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV).

Las fracciones obtenidas a partir de escamas de dorada tanto de escamas desmineralizadas como de gelatina de escamas presentaron una **capacidad secuestrante de radicales ABTS** parecida, de  $27.74 \pm 0.2$  y  $24.1 \pm 0.3$  mg VCEAC/g respectivamente, siendo esta actividad muy inferior a la encontrada en el resto de fracciones estudiadas, que presentaron valores entre 58 y 75 mg



VCEAC/g. La mayor actividad antioxidante encontrada fue en la fracción <1 kDa obtenida mediante hidrólisis con Alcalasa.

La concentración de las diferentes fracciones obtenidas a partir de los hidrolizados de túnica de calamar, necesarias para inhibir el 50% de la **actividad de la ACE** (IC<sub>50</sub>) fue entre 50 y 100 µg /mL, viéndose los mejores resultados en la fracción de túnica de calamar liofilizada y en la fracción de gelatina y escamas desmineralizadas de dorada, siendo la actividad de estas dos fracciones aproximadamente 60 µg /mL (IC<sub>50</sub>).

Únicamente las fracciones procedentes de túnica de calamar presentaron **actividad antimicrobiana**. De las 26 cepas microbianas probadas, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Debaryomyces hansenii* y *Pseudomonas fluorescens* fueron las que presentaron mayor sensibilidad a las fracciones peptídicas de túnica de calamar, siendo la fracción más eficaz en la inhibición del crecimiento de los microorganismos la de 1-3 kDa obtenida con Esperasa, la cual inhibió 20 de las 26 cepas microbianas.

La **actividad** hipoglucemiante, (actividad **inhibidora de la DPP-IV**) se determinó en las fracciones peptídicas procedentes de escamas de dorada, langostinos y túnica de calamar desecada (<1 kDa). Las fracciones peptídicas procedentes de materiales ricos en colágeno presentaron el doble de actividad inhibidora que la fracción obtenida de la hidrólisis de langostinos enteros (IC<sub>50</sub> de 0.23 y 0.46 mg/mL respectivamente).

Para la **encapsulación de las fracciones peptídicas en nanoliposomas** de fosfatidilcolina (PC) se utilizaron las fracciones peptídicas procedentes de escamas de dorada, langostinos y túnica de calamar desecada (<1 kDa).

Las suspensiones fueron caracterizadas tomando en cuenta los siguientes parámetros: el tamaño medio de los liposomas, el índice de polidispersidad, la eficiencia de encapsulación y el potencial zeta.

Los **tamaños de los liposomas** obtenidos presentaron ligeras diferencias entre sí, siendo el diámetro medio de los mismos de alrededor de 100 nm. El

**índice de polidispersidad** fue similar en todos los casos, determinándose valores entre 0.19 y 0.25. Las **eficiencias de encapsulación** fueron de 52, 53 y 74% para las fracciones de langostino, túnicas de calamar y escamas de dorada respectivamente. La estabilidad de los liposomas se determinó mediante el **potencial zeta** de las dispersiones. Los diferentes suspensiones obtenidas mostraron ser muy estables, ya que presentaron valores de potencial zeta entre -40 y -60 mV.

Con el fin de **incorporar los nanoliposomas en sistemas alimentarios** para poder ofertarlo como un alimento nutracéutico se utilizaron los liposomas encapsulando la fracción peptídica de túnica de calamar, con alta actividad antihipertensiva, para su inclusión en geles de gelatina. Al incorporar los liposomas en el gel de gelatina no se apreciaron cambios negativos en las propiedades reológicas y térmicas del gel, además la actividad inhibidora de la ACE de la fracción peptídica se mantuvo constante tras su encapsulación y la posterior incorporación de las nanocápsulas en el gel de gelatina. Esto es indicativo de que el proceso no afecta a la actividad de la fracción peptídica, sino por el contrario, ayuda a preservar la actividad de la fracción peptídica al protegerla en una doble matriz (nanocápsula lipídica–gelatina). En este caso se hizo una comparación con el antihipertensivo sintético Enalapril, y se estableció que una dosis comercial de este medicamento (5mg) sería equivalente a consumir una porción de 100 g de gelatina conteniendo los liposomas.

La segunda aplicación tecnológica fue la incorporación de los liposomas encapsulando la fracción peptídica de langostinos, en películas comestibles de caseinato sódico. Las películas con liposomas se analizaron mediante microscopía electrónica y se observó que éstos permanecieron íntegros en las películas, conservando un diámetro similar al que presentaban antes de su incorporación aunque se pudieron apreciar ligeras diferencias en la forma. Los liposomas se distribuyeron de manera uniforme en la película, manteniendo su estructura y protegiendo a la fracción peptídica en una doble estructura (liposomas-estructura polimérica de caseinato de sodio).



## ***ABSTRACT***



In this study, wastes from the fishing industry were used, all rich in protein material: giant squid tunic, sea bream bones and scales and whole shrimps.

In the majority of studies about obtaining protein hydrolysates from fish collagen-rich byproducts, a first step consists in the extraction of gelatin (denatured collagen) to facilitate the subsequent enzymatic hydrolysis. Bones and scales were analyzed as a source of gelatin, and the angiotensin-I (ACE) inhibitory activity of the scales gelatin hydrolysate was studied. From scales, a yield of 9.55 % of gelatin was obtained, while the extraction yield from bones was very low, for this reason, bones gelatin was rejected for further studies as a source of bioactive hydrolysates.

By enzymatic hydrolysis peptide hydrolysates from giant squid tunics, sea bream gelatin scales, sea bream demineralized scales and whole shrimps were obtained. These hydrolysates were fractionated by ultrafiltration. Fractions with peptide groups below 1 kDa were obtained in all cases, in addition, the squid tunics hydrolysate were fractionated by tangential ultrafiltration, with cutoff membranes of 10, 3 and 1 kD, obtaining three peptide fractions, one from each filtration range.

In this study the antioxidant, antimicrobial, antihypertensive activity, determined by the ACE inhibition, and hypoglycemic activity, determined by DPP-IV inhibition, were studied.

Fractions obtained from demineralized scales and gelatin scales showed radical scavenging activity (ABTS) of  $27.74 \pm 0.2$  and  $24.1 \pm 0.3$  mg VCEAC/g respectively, being this activity lower than that found in the other tested fractions, with values between 58 and 75 mg VCEAC/g. The highest antioxidant activity was found in the <1 kDa fraction obtained from squid tunic by hydrolysis with Alcalase.

The concentration of the different fractions from squid tunic hydrolysates necessary to inhibit the 50 % of ACE activity (IC<sub>50</sub>) was between 50 and 100 µg/mL, being the highest results found in the lyophilized squid tunic fraction,

and in the gelatin and demineralized scales fractions, with similar activity in the latter two cases.

Regarding antimicrobial activity, only the fractions from squid tunic showed antimicrobial activity. Of the 26 microbial strains tested, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Pseudomonas fluorescens* and *Debaryomyces hansenii* were those that showed greater sensitivity to the squid tunics peptide fractions, being the most effective that of 1-3 kDa obtained with Esperase, which inhibited 20 of the 26 microbial strains tested.

The hypoglycemic activity was determined in the peptide fractions from demineralized scales, dried squid tunic (<1 kDa) and shrimps. The inhibitory activity of peptide fractions from collagen-rich material was two-fold higher than the fraction obtained from the shrimp hydrolysate (0.23 and 0.46 mg/mL respectively).

Hydrolysates obtained from giant squid tunics, gelatin scales, demineralized scales and shrimps showed degrees of hydrolysis (DH) between 16 and 20 %.

For the encapsulation of the peptide fractions into nanoliposomes produced from phosphatidylcholine (PC) the lowermost molecular weight peptide fractions from scales, dried squid tunics and shrimps were used.

The suspensions of liposomes were characterised in terms of average size, polydispersity index, encapsulation efficiency and zeta potential.

The liposome sizes slightly differed, with an average diameter of about 100 nm in all cases. In the same way, the polydispersity index was similar in all cases, with values between 0.19 and 0.25.

The encapsulation efficiencies were 52, 53 and 74 % for fractions of shrimp, squid tunics and sea bream scales, respectively. The encapsulation efficiency was higher in the scales fraction, possibly linked to the higher concentration of hydrophobic amino acids.

The stability of liposomes was determined by the zeta potential of the dispersions. The suspensions obtained were shown to be very stable, with values between -40 and -60 mV.

In order to incorporate nanoliposomes into a food system and to offer it as a nutraceutical food, liposomes encapsulating the peptide fraction of squid tunics, with high antihypertensive activity, were incorporated into a gelatin gel. The added liposomes did not induce any changes in the rheological and thermal properties of the gel. The ACE inhibitory activity of the peptide fraction remained constant after encapsulation and addition of the nanocapsules in the gelatin gel, indicating that the process helps to protect the peptides into a double matrix (lipid nanocapsule-gelatin) without affecting their active potential.

The second technological application was the incorporation of liposomes encapsulating the peptide fraction of shrimp, into a sodium caseinate edible film. These were analyzed by electron microscopy and showed slight differences in the shape of liposomes, which proved to remain intact and uniformly distributed in the film. Inside the film, the encapsulated peptides were thus protected in a double structure (liposomes-polymeric structure of sodium caseinate).





## ***INTRODUCCIÓN***



### **1.1. Situación actual de la pesca y la acuicultura.**

Los pescados y mariscos son un recurso natural renovable, el cual ha sido explotado durante miles de años por el hombre. Existen datos arqueológicos revelando que ya se explotaba este recurso hace 125000 años, fecha que coincide con la aparición del *Homo sapiens* moderno (Jackson *et al.*, 2001). En la actualidad, la pesca y la acuicultura suministran unos 154 millones de toneladas de pescado en 2011 a nivel mundial, destinándose el 85% de las capturas al consumo humano, lo que representa el 16.6% del aporte de proteínas animales en la dieta de la población mundial y el 6.5% de todas las proteínas consumidas (FAO, 2012a). El resto de las capturas se destinan principalmente a la producción de harina y aceite para la alimentación de animales de granja (Zugarramurdi *et al.*, 1998). Cerca de 47% del pescado y otros productos pesqueros destinado al consumo humano en 2010 se distribuyó en forma de pescado fresco (FAO, 2012b), por lo tanto un 53% fue procesado de alguna forma para un consumo posterior. Dado que en 2010 la utilización de la pesca y acuicultura para consumo humano fue de 128.3 millones de toneladas, significa que se procesaron aproximadamente 68 millones de toneladas de pescado. Asumiendo un comportamiento similar en 2011, 69.3 millones de toneladas se habrían destinado a la industria de procesamiento de pescado y marisco (No se han encontrado datos publicados más recientes).

#### **1.1.1 Residuos generados por la industria pesquera**

La industria dedicada al procesamiento de productos pesqueros genera una gran cantidad de residuos, tales como pieles, espinas, escamas, vísceras, cabezas y restos de músculo; residuos que dependiendo de la especie y el tipo de procesamiento pueden ser entre 30 y 50% del peso inicial (Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008; Gumisiriza *et al.*, 2009; Giménez *et al.*, 2012). Sin embargo estos desechos son una gran fuente de minerales, proteínas, grasa, pigmentos, vitaminas, etc, por lo que una parte de los mismos se utiliza para la alimentación animal (peces, cerdos) y para la elaboración de fertilizantes; la

parte no aprovechada constituye una importante fuente de contaminación ambiental (Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008).

Últimamente se han desarrollado diversas estrategias para utilizar los residuos de pescados y mariscos, obteniendo productos de alto valor comercial tales como colágeno y gelatina procedentes de pieles, espinas y escamas; productos reestructurados a partir de cortes de músculo; lípidos y proteínas principalmente a partir de vísceras; hidrolizados y péptidos bioactivos (Giménez *et al.*, 2012).

Las espinas, pieles y escamas contienen grandes cantidades de colágeno, que es de gran interés para la industria, ya que esta proteína y sus hidrolizados tienen características deseables para diversas aplicaciones, tanto en el campo de la alimentación, como en el campo de la medicina y cosmética.

### 1.1.2 Especies utilizadas en el presente estudio

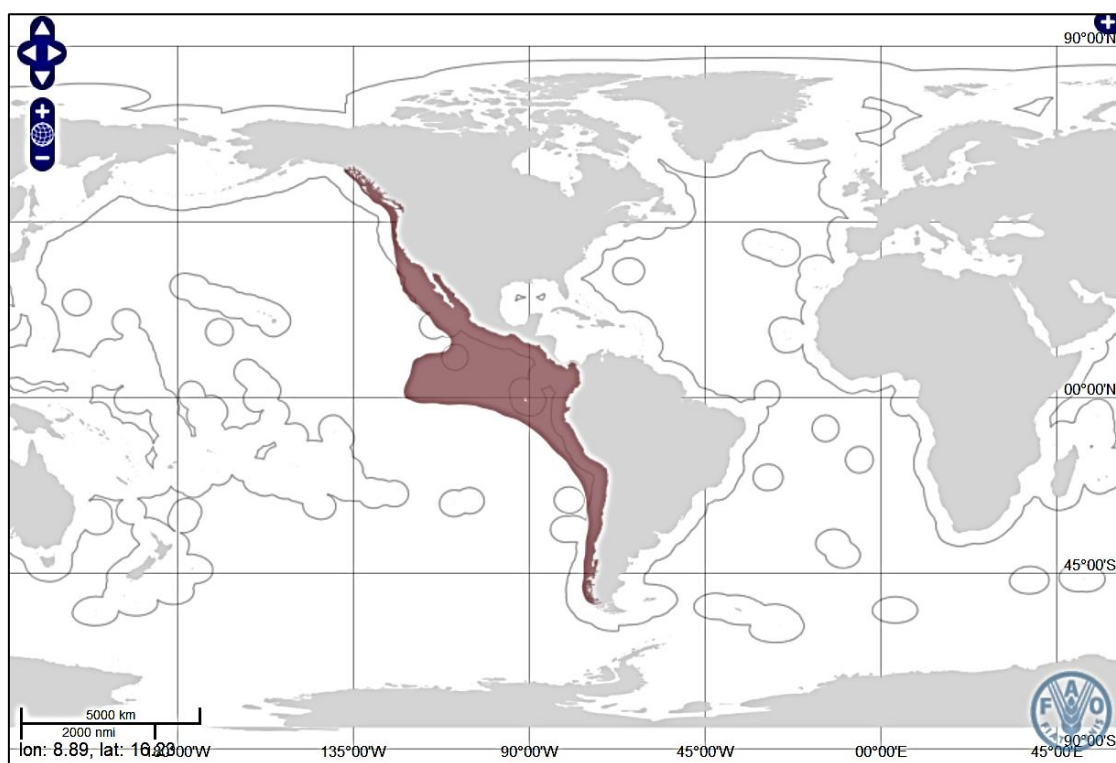
#### 1.1.2.1 Calamar gigante (*Dosidicus gigas*)



Fotografía: Bryan J. Skerry, © 2007 National Geographic Society

**Figura 1.** Calamar gigante (*Dosidicus gigas*)

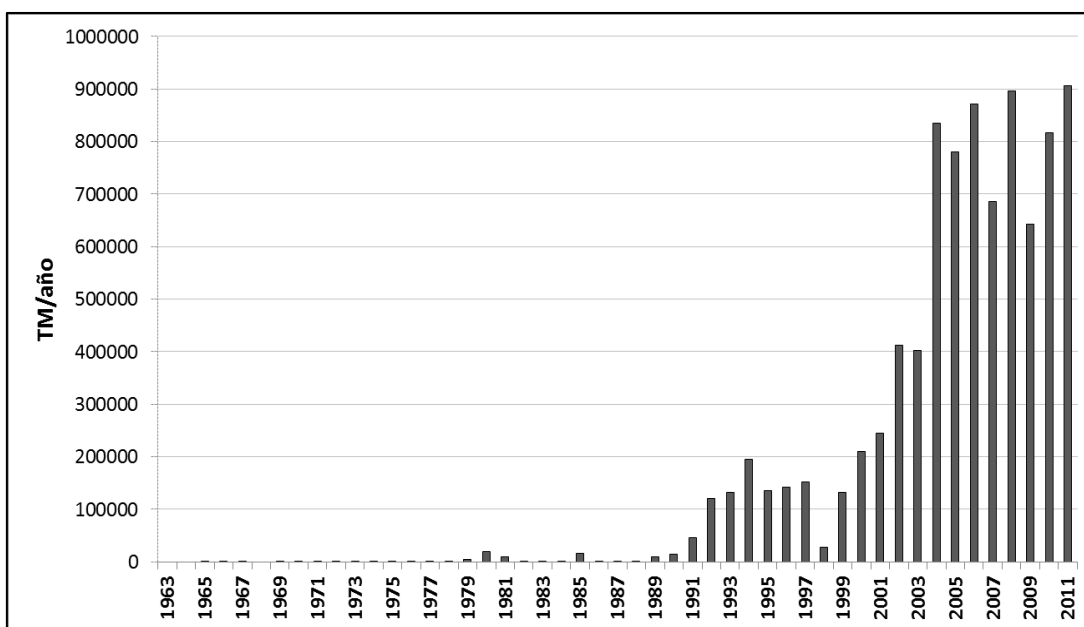
El Calamar gigante (*Dosidicus gigas*, d'Orbigny, 1835) es una especie endémica del Pacífico este (Figura 1). Es el más grande y uno de los más abundantes calamares nectónicos (Markaida & Sosa-Nishizaki, 2003). Se trata de un cefalópodo perteneciente a la familia *Ommastrephidae* y la subfamilia *Ommastrephinae* (Nigmatullin *et al.*, 2001) y se distribuye entre los 37-40° Norte en las costas de California y 45-47° Sur, llegando incluso a los 52° Sur en las costas chilenas (Tierra de Fuego) y entre los 125 y 140° Oeste (Figura 2) (Roper *et al.*, 1984; Iannacone & Alvarino, 2009). Los individuos pueden alcanzar una longitud máxima de 4 metros y su manto dorsal puede medir hasta 1.5 metros y alcanzar un peso de hasta 30-50 kg (Roper *et al.*, 1984; Nigmatullin *et al.*, 2001). Estadísticas de la FAO señalan pescas de 100 TM en el año de 1965, las cuales se han incrementado con el paso del tiempo a 15.000 TM en 1990, 200.000 TM en 2000 y 906.310 TM en 2011 (Figura 3), lo cual indica un sustancial incremento en el uso de este recurso en los últimos años.



Fuente: FAO-FI ([www.fao.org/fishery](http://www.fao.org/fishery))

**Figura 2.** Distribución geográfica del calamar gigante.

Esta especie es comercializada principalmente en países de Europa y Asia, debido a su alto porcentaje de porción comestible (60-80%) y su aptitud para la transformación industrial (Blanco-Pascual *et al.*, 2013). Debido a su alto contenido en proteína también ha sido utilizado para la elaboración de harinas para pienso en especial para alimento destinado a la cría de gambas (*Penaeus vannamei*) (Abugoch *et al.*, 1999; Córdova-Murueta & García-Carreño, 2002; Torres-Arreola *et al.*, 2008). Además, el hidrolizado de proteína de *D. gigas* es un excelente suplemento utilizado en la alimentación de estos crustáceos (FAO, 2010).



© FAO - Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service - 18/07/2013

**Figura 3.** Captura anual de *Dosidicus gigas*

Los moluscos son muy importantes en la alimentación humana ya que proporcionan al organismo una fuente esencial de proteínas de alto valor biológico y bajo contenido en grasas (Tabla 1). Además, el calamar presenta un alto contenido en agua y bajo en carbohidratos, lo que significa un menor contenido calórico (Abugoch *et al.*, 1999).

El aprovechamiento del calamar gigante no es integral. En la industria del calamar destinada al consumo humano, sólo se aprovecha la parte comestible (en torno al 40%) y el resto es habitualmente desechado (Torres-Arreola *et al.*, 2008). Algunos subproductos de esta industria (túnica y restos de músculo) podrían ser utilizados, aplicando tecnologías enzimáticas, para obtener productos de alto valor añadido, como colágeno, gelatina o hidrolizados proteicos (Hsu, 2010).

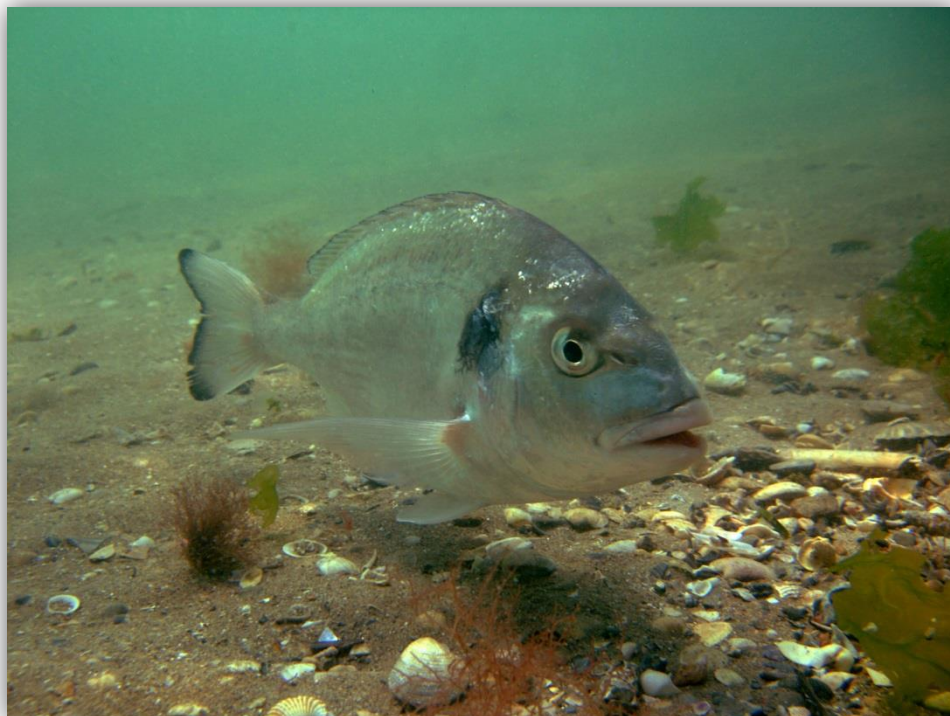
**Tabla 1.** Comparación de composición química porcentual entre *Dosidicus gigas* y otras especies.

Especie	Cal/100g	Humedad	Proteínas	Cenizas	Grasas	Carbohidratos
<b>Calamar Gigante</b> <b>(<i>Dosidicus gigas</i>)</b>	70.19	82.23	15.32	1.31	0.87	0.27
<b>Calamar</b> <b>(<i>Loligo pelai</i>)</b>	73.8	82.3	14.94	1.2	1.56	0
<b>Calamar</b> <b>(<i>Illex illecebrosus</i>)</b>	77.7	81.12	16.05	1.33	1.5	0
<b>Calamar</b> <b>(<i>Loligoidae</i> y <i>Ommastrephidae</i>)</b>	87.06	78.55	15.58	1.41	1.38	3.08
<b>Pulpo</b> <b>(<i>Octopus vulgaris</i>)</b>	77.8	80.25	14.91	1.6	1.04	2.2
<b>Loco</b> <b>(<i>Conchalepas conchalepas</i>)</b>	113.3	71.1	21.7	1.2	0.5	5.5
<b>Abalón</b> <b>(<i>Haliotis</i> spp.)</b>	99.28	74.56	17.1	1.57	0.76	6.01
<b>Filete de vacuno</b>	129	72.7	21.2	1.1	3.9	1.1

Fuente: Abugoch *et al.* Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 1999.



#### 1.1.2.2 Dorada (*Sparus aurata*)

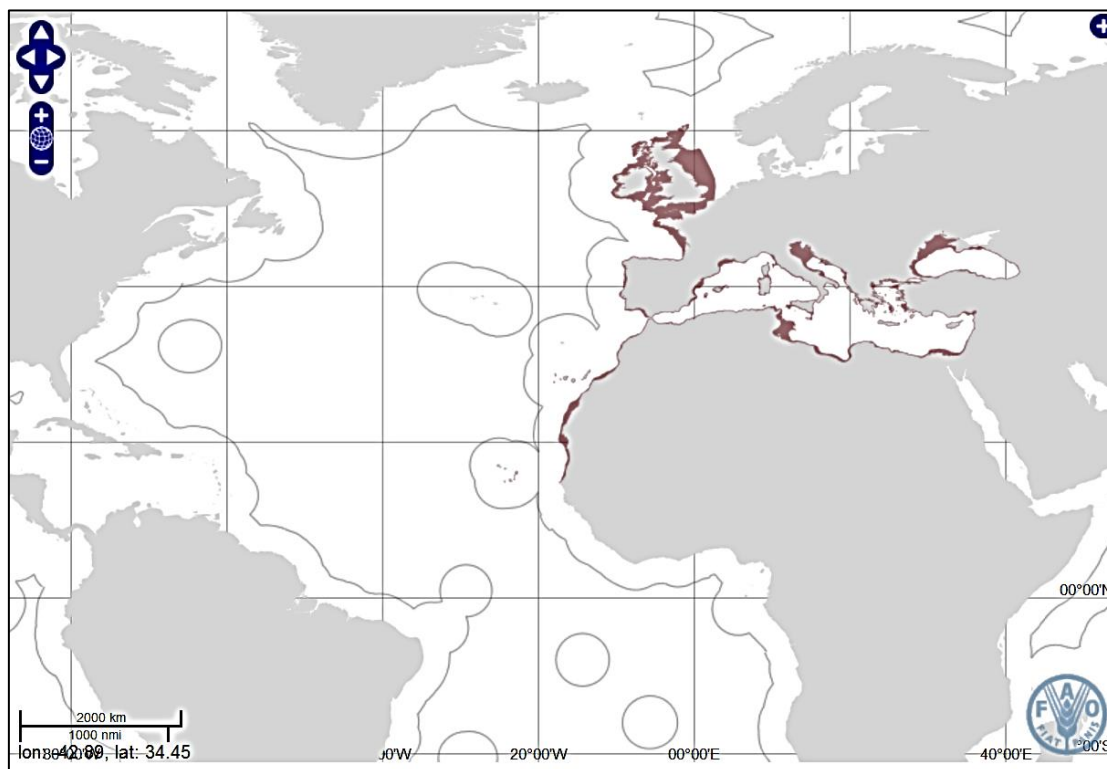


Fuente: Laguna Project ([www.lagunaproject.it](http://www.lagunaproject.it))

**Figura 4.** Dorada (*Sparus aurata*)

La dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) es un teleósteo común del mar Mediterráneo y una de las especies más comúnmente utilizadas en acuicultura, tanto en la cría en estanques como en jaulas en el mar (Guinea & Fernandez, 1997). En vida silvestre, las especies costeras habitan sobre fondos rocosos, arenosos, fangosos o en praderas de algas, así como en zona de rompientes, comúnmente a profundidades de unos 30 metros, aunque se pueden encontrar individuos adultos hasta 150 metros de profundidad. Tienen un comportamiento demersal y aunque es una especie marina, pueden ser encontrados en aguas salobres de lagunas litorales y marismas. Tolera amplias variaciones de temperatura y salinidad del agua. Se distribuyen por las costas orientales del océano Atlántico, desde las Islas Británicas, el Estrecho de Gibraltar y

alrededor de las Islas Canarias hasta Cabo Verde y por todo el mar Mediterráneo (Figura 5).

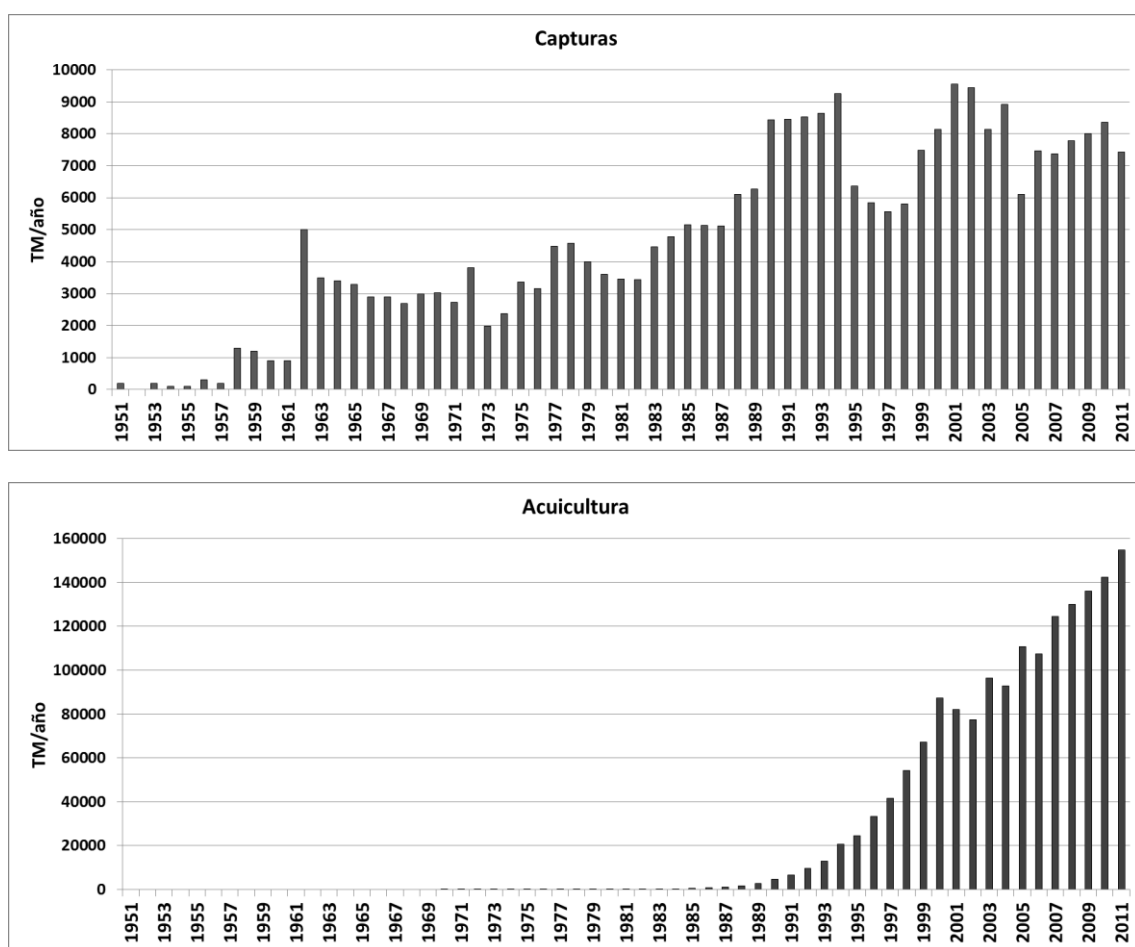


Fuente: FAO-FI ([www.fao.org/fishery](http://www.fao.org/fishery))

**Figura 5.** Distribución geográfica de la dorada.

Su dieta es principalmente carnívora, se alimentan de moluscos, crustáceos y peces (Arias, 1980; APROMAR, 2012; FAO, 2013).

La mayor parte de la producción actual procede de la acuicultura, de hecho, en 2011 tan sólo un 4.6% de la producción total fue aportado por la pesca extractiva (Figura 6).



© FAO - Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service - 18/07/2013

**Figura 6.** Producción anual de Dorada (*Sparus aurata*)

La mayor parte de la producción se localiza en el Mediterráneo, siendo Grecia el mayor productor en 2011, con el 37.9% de la producción total (acuicultura y pesca), seguido de Turquía con el 22% y España con el 11.3%. Con respecto al consumo, Italia es el principal mercado, país al que llega el 32.4% de la producción mundial de Dorada, seguido de España con el 13% y Turquía con el 11.7% (APROMAR, 2012).

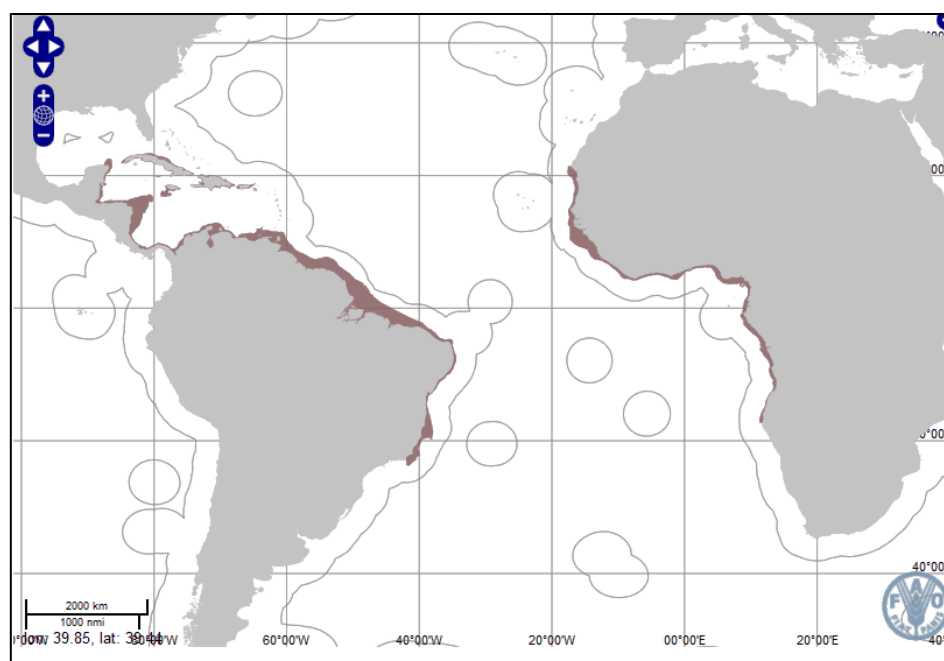
### 1.1.2.3 Langostino (*Penaeus notialis*)



Fuente: Monterey Bay Aquarium ([www.montereybayaquarium.org](http://www.montereybayaquarium.org))

**Figura 7.** Langostino (*Penaeus notialis*)

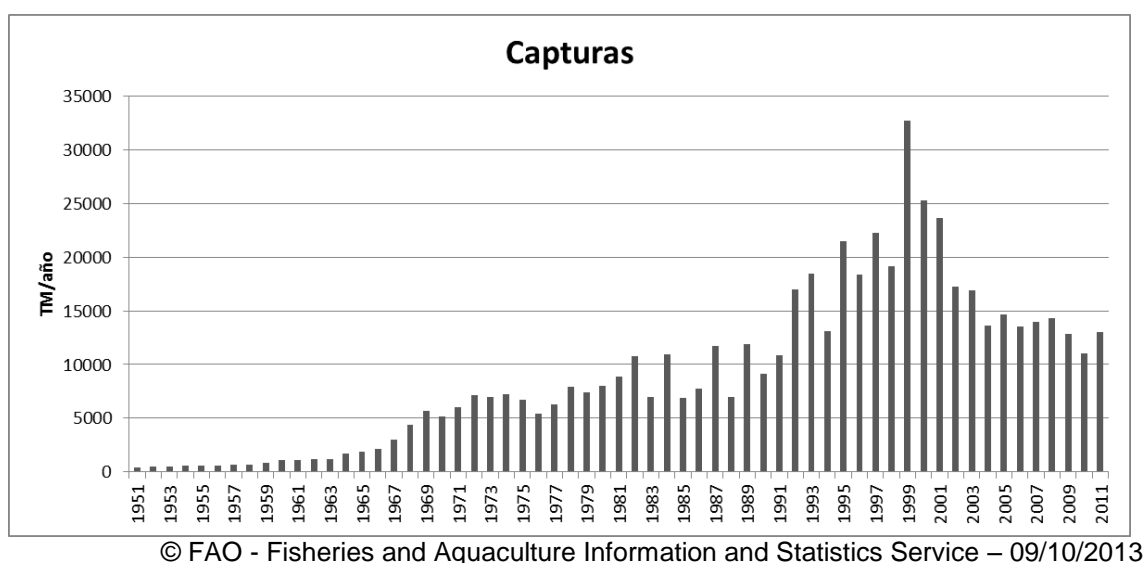
El langostino (*Penaeus notialis*, Pérez-Farfante, 1967) es un crustáceo que habita en las costas atlánticas, al este desde Mauritania hasta Angola, y al oeste desde Cuba en las Antillas Mayores, hasta Río de Janeiro en Brasil (Figura 8). Esta especie habita en fondos fangosos, fango-arenosos y rellenos arenosos entre las rocas, entre 3 y 100 metros de profundidad, siendo raramente vistos hasta 700 metros de profundidad. Prefiere las arenas supra termoclinas fangosas de partículas finas y abundante materia orgánica, donde la temperatura es de 25 °C. El macho alcanza un tamaño máximo de 175 mm con una longitud máxima del caparazón de 41mm, mientras que la hembra alcanza los 192 mm con una longitud máxima del caparazón de 48mm (Holthuis, 1980).



Fuente: FAO-FI ([www.fao.org/fishery](http://www.fao.org/fishery))

**Figura 8.** Distribución geográfica del langostino (*Penaeus notialis*)

El langostino es capturado principalmente en la costa africana, siendo entre los crustáceos, la especie más abundante y de mayor importancia comercial en Nigeria. Además, es una de las especies con mayor valor comercial en las Antillas Mayores, la costa atlántica de Centroamérica, Venezuela y varias áreas de Brasil (Holthuis, 1980; Gillett, 2010). En 2011 las capturas de esta especie se cifraron en 13.002 toneladas, valor que ha sido similar desde el 2004. Sin embargo, las capturas alcanzaron las 32.721 toneladas en 1999 (Figura 9)



**Figura 9.** Capturas anuales de *Penaeus notialis*

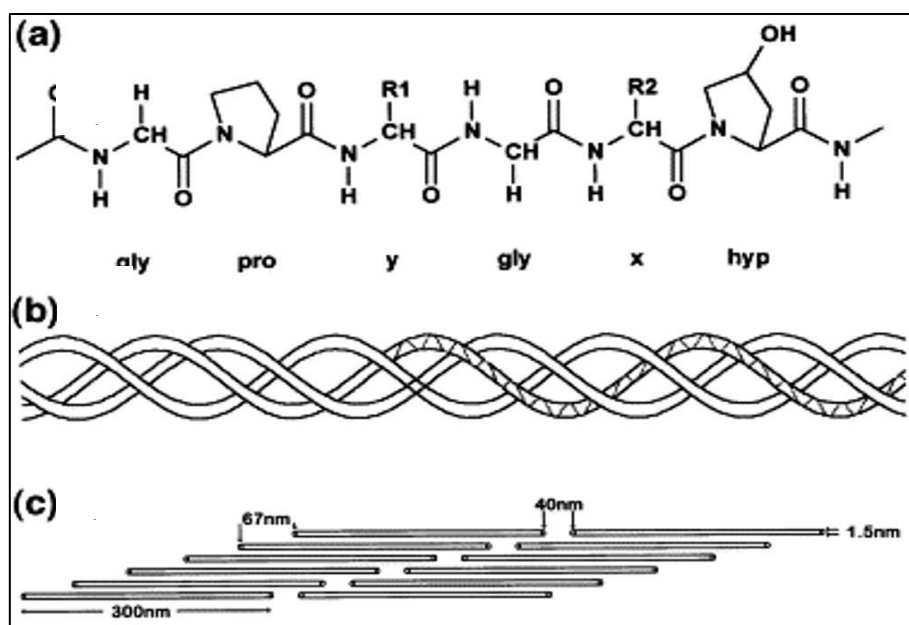
De acuerdo a estadísticas publicadas por la FAO (Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service), las capturas mundiales de gambas y langostinos alcanzaron en 2011 las 3.288.467 toneladas, valor que ha permanecido similar durante los últimos 7 años. Sin embargo los descartes estimados representan el 27.3% del total de capturas, y la tasa ponderada de descartes para todas las pesquerías de gambas y langostinos es del 62.3%, tasa muy elevada si se compara con la de otras pesquerías (Kelleher, 2005; Gillett, 2010).

## 1.2. Colágeno

El colágeno es probablemente la proteína más abundante en el organismo de los vertebrados. Su molécula consiste en tres cadenas polipeptídicas helicoidales denominadas cadenas  $\alpha$ , cada una de éstas conformadas por aproximadamente 1000 aminoácidos. Estas cadenas se enrollan formando una triple hélice que se mantiene mediante puentes de hidrógeno intermoleculares. Hasta el momento se han identificado 46 diferentes cadenas polipeptídicas en vertebrados, las cuales componen 28 diferentes tipos de colágeno (Brinckmann, 2005; Shoulders & Raines, 2009). Cada uno de estos tipos de colágeno lleva a cabo funciones especializadas en diversos tejidos y tienen modos distintivos de organización supramolecular. Los más abundantes forman la base estructural de la piel, tendones, huesos y cartílagos entre otros tejidos, concentrándose en mayor proporción los de tipo I, II y III, siendo el colágeno de tipo I el predominante en la mayoría de animales (Brodsky & Persikov, 2005).

### 1.2.1. Colágeno Tipo I

El colágeno tipo I es el más abundante del organismo, constituyendo alrededor del 90% del colágeno presente en el cuerpo (Eyre, 1980). Existen pocas diferencias en las cadenas de colágeno tipo I entre las diferentes especies de vertebrados (Friess, 1998). Está compuesto por 2 cadenas helicoidales  $\alpha_1$  y una cadena helicoidal  $\alpha_2$  formando una triple hélice. La hélice simple de colágeno es levógira con 3.3 residuos por vuelta y una altura del giro de 0.87 nm (Figura 10b) (Friess, 1998). La conformación molecular de las cadenas helicoidales la compone un patrón repetitivo de Gly-X-Y (Figura 10, a) permitiendo el entrelazamiento de las cadenas mediante puentes de hidrógeno intercatenarios  $\text{N-H}_{(\text{Gly})}\cdots\text{O}=\text{C}_{(\text{Xaa})}$  (Shoulders & Raines, 2009).



Fuente: (Friess, 1998)

**Figura 10.** Estructura química del colágeno tipo I a) Secuencia primaria de aminoácidos b) triple hélice (izquierda: estructura secundaria; derecha: estructura terciaria) c) estructura cuaternaria escalonada.

La estructura terciaria del colágeno la forman tres cadenas polipeptídicas entrelazadas formando la triple hélice dextrógira con una altura de giro de aproximadamente 8.6 nm. Esta estructura, conocida como tropocolágeno, tiene una masa molecular de aproximadamente 300 kDa, una longitud de 300 nm y un diámetro de 1.5 nm (Figura 10, c). Las moléculas de tropocolágeno interactúan entre sí, asociándose lateralmente mediante enlaces covalentes formando fibrillas colagenosas, que tienen un diámetro entre 10 y 500 nm, dependiendo del tipo de tejido y la etapa de desarrollo. Al formar las fibrillas, las moléculas de tropocolágeno se escalonan entre sí presentando una estriación transversal repetida de 67 nm y una brecha adicional de 40 nm entre moléculas subsiguientes (Friess, 1998).

### 1.2.2. Gelatina

La gelatina es una proteína compleja que se obtiene mediante la hidrólisis parcial del colágeno. La estructura de triple hélice del colágeno se desintegra mediante la destrucción de los puentes de hidrógeno y los enlaces



hidrofóbicos, seguido del desenredo de las cadenas y la disociación de las moléculas en componentes más pequeños provocando la solubilización del colágeno (de Wolf, 2003). La gelatina, por tanto, está constituida por un conjunto de cadenas polipeptídicas que tienen un peso molecular inferior al del colágeno, y dependiendo de la especie y del proceso de extracción puede variar entre ~10 y ~300 kDa (Gómez-Guillén *et al.*, 2002; Kolodziejska *et al.*, 2008). Las cadenas de gelatina son altamente solubles y dan lugar a la formación de una red tridimensional en frío, resultado de su tendencia a volver a formar parcialmente la estructura de colágeno nativo. De la extensión en la formación de enlaces y entrecruzamientos en la red dependerá la fuerza del gel y la estabilidad térmica. Estos dos parámetros son los principales indicadores de la calidad de la gelatina comercial (Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

Este biopolímero es ampliamente usado en la industria alimentaria, tanto por sus propiedades funcionales, como por su elevado contenido en proteína (Giménez *et al.*, 2005b). En el campo de la medicina y farmacia, la gelatina es utilizada para múltiples aplicaciones como por ejemplo como hidrogeles, como matriz para implantes, en micro esferas inyectables para la liberación controlada de fármacos y para infusiones intravenosas entre otras. En la industria farmacéutica la gelatina es ampliamente usada para la fabricación de cápsulas blandas y duras, expansores plasmáticos y en la fabricación de apósitos para el tratamiento de heridas (Karim & Bhat, 2009).

Industrialmente, la gelatina se obtiene principalmente a partir de pieles y huesos de cerdo y vacuno, siendo la piel de cerdo la principal fuente, ya que de esta materia prima procede el 44% de la gelatina producida a nivel mundial; mientras que sólo alrededor del 1% de la producción procede de especies distintas a la porcina y vacuna (Ahmad & Benjakul, 2011). Sin embargo cada vez existe una mayor demanda de gelatinas obtenidas de fuentes alternativas. Esto se debe a la preocupación y reticencias por parte de ciertos grupos de consumidores con respecto al uso de subproductos procedentes de vacuno y porcino. Tanto el islamismo como el judaísmo prohíben el consumo de productos procedentes de porcino, así como el hinduismo evita el consumo de

productos procedentes del cuerpo de la vaca (Karim & Bhat, 2009). Si se analiza estos tres sectores, juntos en 2010 representaron el 36.3% de la población mundial, lo que se traducía en 2.510'879.720 personas (Turner, 2010). Esto ha llevado a los investigadores a buscar nuevas fuentes de colágeno, para obtener gelatina de calidad, siendo la principal alternativa, el colágeno procedente de especies acuáticas (Karim & Bhat, 2009).

#### 1.2.2.1. *Gelatina procedente de subproductos de la pesca*

La producción industrial de gelatina procedente de subproductos de la pesca ha ido incrementando en los últimos años (Gómez-Guillén *et al.*, 2009). Esto responde a la creciente demanda de gelatinas de fuentes distintas a las procedentes de especies terrestres, así como a la gran cantidad de residuos ricos en colágeno generados por la industria pesquera. De estos, los recortes de pieles, espinas y escamas son las principales fuentes de colágeno.

Sin embargo, la gran variedad de especies acuáticas dan como resultado gelatinas con muy diversas características. Esto ha despertado el interés dentro de la comunidad científica por caracterizar las gelatinas obtenidas de las diferentes especies, tanto sus características físico-químicas como sus propiedades funcionales, además de optimizar las condiciones de extracción, así como los rendimientos (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). De este modo, se ha notado que la composición de la molécula de colágeno está relacionada con la temperatura del hábitat de donde proceden las especies, de modo que las gelatinas extraídas a partir de especies de aguas cálidas tienden a poseer mejores propiedades reológicas y mayor termoestabilidad que las gelatinas obtenidas a partir de especies de agua fría (Giménez *et al.*, 2009b; Kharyeki *et al.*, 2011). Sin embargo, la calidad de la gelatina dependerá además del tipo de especie, de la edad del animal, del tejido del cual se extrae la gelatina, ya sea piel, espinas o escamas y principalmente del método de extracción (Gómez-Guillén *et al.*, 2009). Al aplicar largos tiempos de extracción, así como altas temperaturas, aunque se obtienen mejores rendimientos, producirán una gelatina con un mayor número de cadenas cortas, lo que se traduce en una

gelatina de peor calidad. De igual forma, independientemente de si el método de extracción sea ácido o básico, altas concentraciones de ácido o base tendrán el mismo efecto, un mayor rendimiento pero una gelatina de peor calidad (Boran & Regenstein, 2010). Es por esto que resulta importante la optimización de los procesos de extracción para cada especie y tipo de tejido.

### **1.2.3. Hidrolizados peptídicos a partir de colágeno y gelatina**

Al hidrolizar las proteínas se pueden mejorar diversas características funcionales, tales como la solubilidad, viscosidad, capacidad de agitación y dispersión, características que brindan ventajas para el uso en muchos productos alimenticios frente a las proteínas originales (Benítez *et al.*, 2008). Por otra parte, al hidrolizar una proteína se mejora su biodisponibilidad. Además, muchos de los péptidos obtenidos producto de la hidrólisis poseen propiedades bioactivas que pueden afectar numerosas funciones fisiológicas en el organismo (Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

La gelatina, que como se mencionó anteriormente es producto de la hidrólisis parcial del colágeno, tiene una larga historia como parte de la dieta humana. Aunque existen evidencias de su uso en países orientales como regulador de la presión sanguínea, y para el tratamiento de hemorragias, el primer efecto benéfico del colágeno conocido en occidente fue publicado por la abadesa alemana Hildegarda de Bingen en 1175, quien describió que el consumo de gelatina mejora el estado de las articulaciones reduciendo el dolor (Iwai *et al.*, 2005). Actualmente se ha descrito un hidrolizado procedente de colágeno, obtenido por hidrólisis de una gelatina farmacéutica con el uso de una enzima aprobada por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) como agente terapéutico de potencial utilidad en el tratamiento de la osteoartritis y osteoporosis (Moskowitz, 2000).

Además, se ha descrito que la ingestión oral de péptidos de colágeno afecta varias funciones en el organismo, mostrando efectos positivos en el crecimiento del cabello y sus propiedades, en la calidad de las uñas, así como beneficios en huesos y tendones (Matsuda *et al.*, 2006).

En los últimos años se han descrito hidrolizados peptídicos y péptidos procedentes del colágeno con actividades antioxidante, antihipertensiva y anticancerígena (Byun & Kim, 2001; Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Alemán *et al.*, 2011c).

### 1.3. Hidrólisis enzimática

La hidrólisis es un proceso químico en el cual, una molécula se rompe en dos partes como consecuencia de la adición de una molécula de agua. La reacción se produce cuando uno de los fragmentos de la molécula original gana un ion hidrógeno ( $H^+$ ) de la molécula de agua, mientras que el otro fragmento recoge el grupo hidroxilo restante ( $OH^-$ ) (Umesh Kumar *et al.*, 2011).

Las enzimas son moléculas, en su mayoría de naturaleza proteica, que catalizan las reacciones químicas en los sistemas biológicos. Tienen un gran poder catalítico y poseen un alto grado de especificidad respecto a sus sustratos (Nelson & Cox, 2005). Para su nomenclatura, se adoptó un sistema de identificación en el que a cada enzima se le asigna una serie de cuatro dígitos, al que se ha llamado número de la EC (Enzyme Commission). La clasificación internacional se presenta en la (Tabla 2).

El primer dígito está relacionado con la reacción química que cataliza la enzima. El segundo dígito de la nomenclatura corresponde a la subclase de enzima; el tercer dígito es una subdivisión y ofrece más información con respecto al sustrato que utiliza la enzima; y finalmente el cuarto dígito indica el número serial de la enzima en el grupo correspondiente (Badui, 2006).

Las enzimas tienen la capacidad de catalizar reacciones químicas de manera muy específica; es decir, su intervalo de acción se limita a un determinado tipo de compuesto que debe reunir ciertas características estructurales para que pueda ser utilizado como sustrato.

La reacción de hidrólisis catalizada por una hidrolasa es lo que se conoce como hidrólisis enzimática. Las hidrolasas se dividen en 13 grupos dependiendo del tipo de enlace sobre el que actúan. En la hidrólisis de proteínas se produce la ruptura del enlace peptídico.

**Tabla 2.** Clasificación internacional de las enzimas

Grupo	Clase	Tipo de reacción catalizada
<b>EC1</b>	Oxidorreductasas	Reacciones de oxidoreducción o redox
<b>EC2</b>	Transferasas	Reacciones de transferencia de grupos activos
<b>EC3</b>	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
<b>EC4</b>	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
<b>EC5</b>	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
<b>EC6</b>	Ligasas	Formación de enlaces C-O, C-C, C-S o C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la rotura de ATP

El grupo de enzimas EC 3.4 actúan sobre los enlaces peptídicos catalizando esta reacción. Dentro de este subgrupo se identifican dos sub-subclases de peptidasas, las exopeptidasas (EC 3.4.11-19) y las endopeptidasas (EC 3.4.21-25 y EC 3.4.99). Las exopeptidasas actúan cerca de los extremos de las cadenas polipeptídicas. Actúan en el extremo N-terminal liberando un simple residuo de aminoácido (aminopeptidasas, EC 3.4.11), o un dipéptido, o un tripéptido (dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas, EC 3.4.14) y en el extremo C-terminal liberando un simple residuo (carboxipeptidasas, EC 3.4.16-18), o un dipéptido (peptidil-dipeptidasas EC 3.4.15). Otras exopeptidasas son exclusivas para dipéptidos (dipeptidasas, EC 3.4.13) o eliminan residuos terminales que están sustituidos, ciclados o unidos por enlaces isopeptídicos

(omegapeptidasas, EC 3.4.19). Las endopeptidasas actúan en los enlaces peptídicos internos de las proteínas y se dividen en sub-subclases dependiendo de su mecanismo catalítico, así: serina endopeptidasas (EC 3.4.21 ), cisteína endopeptidasas (EC 3.4.22 ), aspártico endopeptidasas (EC 3.4.23 ), metaloendopeptidasas (EC 3.4.24 ) y treonina endopeptidasas (EC 3.4.25 ). Las endopeptidasas que no pudieron ser asignados a cualquiera de los sub - subclases EC 3.4.21-25 se enumeran en el sub - subclase EC 3.4.99 (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), 2013).

Como resultado de la hidrólisis enzimática de proteínas se obtienen péptidos y aminoácidos; su composición final dependerá de la fuente proteica, del tipo de enzima o enzimas utilizadas, de las condiciones de hidrólisis y del grado de hidrólisis alcanzado en la reacción (Benítez *et al.*, 2008). Sin embargo al hidrolizar las proteínas no sólo ocurre un cambio a nivel molecular, también se alteran sus propiedades funcionales, tales como la solubilidad y estabilidad térmica, que se incrementan al hidrolizar la proteína, así como sus propiedades emulsificantes (siempre y cuando no se alcance un grado de hidrólisis muy elevado). Además de alterarse sus propiedades reológicas, disminuyendo la viscosidad, se incrementa considerablemente la osmolaridad en los hidrolizados y se modifican sus propiedades organolépticas. Ciertos estudios han demostrado que al reducirse el tamaño molecular de proteínas a péptidos y aminoácidos se reduce la alergenicidad de las proteínas y se incrementa su digestibilidad (Neklyudov *et al.*, 2000). Cada una de estas propiedades son aprovechadas en el campo de la alimentación o de la medicina en diferentes áreas, tales como suplementos alimenticios para pacientes con desórdenes digestivos, alergias alimentarias, personas de avanzada edad, deportistas. También se emplean como saborizantes, aditivos para modificar la textura de ciertos alimentos, para la fabricación de suplementos dietéticos para el control de peso, fabricación de piensos para nutrición animal, entre otros usos. Sin embargo los hidrolizados proteicos son mucho más que una fuente de nitrógeno para la dieta. Sirven para el incremento de la producción de anticuerpos monoclonales, además de incrementar la productividad de varios

fármacos terapéuticos producidos por células animales y microorganismos recombinantes. También son utilizados en la fabricación de vacunas y como coadyuvantes en las mismas, en la fabricación de probióticos, cultivos iniciadores (fermentos), en fermentaciones industriales como fuente de compuestos nitrogenados, como ingrediente en la fabricación de medios para el cultivo de microorganismos, para regular el crecimiento de plantas e incrementar su resistencia a plagas, y también han sido utilizados en biorremediación impulsando el crecimiento de ciertos microorganismos (Pasupuleti & Demain, 2010). En los últimos años se han descrito hidrolizados peptídicos y péptidos con diversas actividades biológicas, aunque en muchas ocasiones la actividad mostrada no es la mejor opción entre las moléculas existentes otras veces las actividades mostradas son francamente competitivas con las utilizadas más habitualmente.



#### 1.4. Actividades biológicas de los péptidos

Las proteínas de la dieta son una fuente de péptidos biológicamente activos. Éstos se encuentran inactivos en la secuencia proteica original. Sin embargo pueden ser liberados durante el procesado de los alimentos, durante la digestión gastrointestinal o la fermentación. Una vez que son liberados, los péptidos bioactivos pueden afectar a numerosas funciones fisiológicas del organismo (Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

Para la producción de estos hidrolizados y péptidos, se han utilizado una serie de proteasas comerciales, entre las que se encuentran la tripsina, quimotripsina, pepsina, Alcalasa, properasa E, pronasa, colagenasa, bromelina y papaína (Kim *et al.*, 2001b; Mendis *et al.*, 2005b; Lin & Li, 2006; Yang *et al.*, 2008).

La especificidad de las proteasas afecta al tamaño, cantidad, composición de aminoácidos libres, tipo de péptidos y sus secuencias de aminoácidos, lo que a su vez influye en la actividad biológica de los hidrolizados (Chen *et al.*, 1995; Jeon *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003).

El peso molecular promedio de hidrolizados de proteínas es uno de los factores más importantes que determina sus propiedades biológicas, por lo que las fracciones peptídicas de hidrolizados proteicos pueden variar en su eficacia para una determinada actividad biológica. Un sistema de ultrafiltración por membranas puede ser un método útil y ventajoso industrialmente para la obtención de fracciones peptídicas de un tamaño molecular deseado y una mayor actividad biológica, dependiendo de la composición del hidrolizado inicial y la actividad que se esté estudiando (Jeon *et al.*, 1999; Cinq-Mars & Li-Chan, 2007; Picot *et al.*, 2010). Este sistema ha sido aplicado con éxito en el fraccionamiento y la caracterización funcional de los hidrolizados de gelatina de túnica de calamar o cobia (Lin & Li, 2006; Yang *et al.*, 2008) y también como un primer paso en el aislamiento y purificación de péptidos bioactivos procedentes de colágeno y otras fuentes proteicas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Saiga *et al.*, 2008).

Los péptidos derivados del colágeno y gelatina han exhibido numerosas bioactividades como: actividad antioxidante, antihipertensiva/inhibidora de la ACE (enzima convertidora de angiotensina), antimicrobiana, capacidad de unión a minerales, efecto reductor de lípidos, actividad inmunomoduladora y efectos beneficiosos sobre la piel, los huesos o las articulaciones (Jung *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006b; Hou *et al.*, 2009; Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

#### **1.4.1. Actividad antihipertensiva**

La hipertensión es un importante factor de riesgo para muchas de las más graves enfermedades cardiovasculares (Kim *et al.*, 2012). La presión arterial en el cuerpo humano está regulada principalmente por dos sistemas: el sistema renina angiotensina y el sistema calicreína-cinina. La enzima convertidora de la angiotensina I (ACE; dipeptidil carboxipeptidasa, EC3.4.15.1) puede causar hipertensión, destruyendo el equilibrio de los dos sistemas (Qu *et al.*, 2010), ya que promueve la separación del dipéptido carboxiterminal de la angiotensina I, convirtiéndola en angiotensina II, que es un octapéptido con una potente actividad vasoconstrictora. Por otra parte, la ACE actúa inactivando la bradiquinina, un péptido con potente acción vasodilatadora (FitzGerald *et al.*, 2004; Aleixandre Artiñano *et al.*, 2009). Esta acción favorece el incremento de la presión arterial. Los péptidos antihipertensivos pueden inhibir las actividades de la ACE, al igual que los medicamentos utilizados comúnmente para controlar la presión arterial (Muguerza *et al.*, 2006).

Desde el descubrimiento de péptidos inhibidores de la ACE en el veneno de la serpiente, muchos estudios han tratado de sintetizar inhibidores de esta enzima, como captopril, enalapril, lisinopril y alacepril, que se utilizan ampliamente en el tratamiento de la hipertensión y la insuficiencia cardiaca en humanos (Ondetti *et al.*, 1977; Patchett *et al.*, 1980). Sin embargo, los inhibidores sintéticos de la ACE producen ciertos efectos secundarios más o menos severos, tales como tos, alteraciones del gusto, erupciones en la piel o angioedema (Atkinson & Robertson, 1979). Por lo tanto, en los últimos años,

numerosos investigadores en todo el mundo se han concentrado en la búsqueda de fuentes naturales de inhibidores de la ACE, tales como las proteínas de los alimentos, que aunque menos potentes que los sintéticos no tienen efectos secundarios conocidos.

Aunque la mayor fuente natural de péptidos inhibidores de la ACE identificados hasta la fecha es la leche, estos péptidos han sido aislados de muchas otras fuentes proteicas, tanto animales como vegetales tales como: proteínas de la sangre (Mito *et al.*, 1996), albúmina de huevo (Miguel *et al.*, 2004), maíz (Miyoshi *et al.*, 1991), garbanzo (Yust *et al.*, 2003), soja (Wu & Ding, 2001) y proteínas del músculo de cerdo, bovino, pescado y pollo (Fujita & Yoshikawa, 1999; Fujita *et al.*, 2000; Katayama *et al.*, 2003; Jang & Lee, 2005; Ahhmed & Muguruma, 2010). El colágeno y la gelatina también han demostrado ser una buena fuente de péptidos antihipertensivos, a pesar de no haber sido tan ampliamente estudiados como otras fuentes proteicas. Potentes hidrolizados y péptidos inhibidores de la ACE se han obtenido a partir de materiales ricos en colágeno, no sólo de especies terrestres, tales como colágeno de piel porcina (Ichimura *et al.*, 2009), gelatina de piel bovina (Kim *et al.*, 2001a), huesos y patas de pollo (Saiga *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009); sino también de fuentes marinas, tales como pieles de pescado (Byun & Kim, 2001; Park *et al.*, 2009), cartilago de pescado (Nagai *et al.*, 2006), escamas (Fahmi *et al.*, 2004), túnica de calamar (Alemán *et al.*, 2011b) y pepinos de mar (Zhao *et al.*, 2007).

Aunque la relación entre la estructura y la actividad de los péptidos inhibidores de la ACE no se ha establecido aún, estos péptidos tienen ciertas características comunes. La mayoría de ellos son secuencias relativamente cortas, de bajo peso molecular, ya que péptidos de alto peso molecular no pueden acceder al centro activo de la enzima. La unión a la ACE está fuertemente influenciada por la secuencia tripeptídica C-terminal, que puede interactuar con tres regiones del centro activo de la enzima (Ondetti & Cushman, 1982). La ACE prefiere sustratos o inhibidores que contienen residuos de aminoácidos hidrofóbicos (cadenas laterales aromáticas o ramificadas) en cada una de las tres posiciones C-terminal (Cheung *et al.*,

1980; Murray & FitzGerald, 2007) Se ha descrito también que la presencia de Arg o Lys en el extremo C-terminal contribuye sustancialmente a la actividad inhibidora (Cheung *et al.*, 1980; Ariyoshi, 1993). La actividad inhibidora de la ACE descrita para los hidrolizados y péptidos de colágeno y gelatina puede estar relacionada con la alta concentración de aminoácidos hidrofóbicos, así como con altos niveles de Pro (Murray & FitzGerald, 2007; Pihlanto *et al.*, 2008; Contreras *et al.*, 2009). Este aminoácido parece ser uno de los más eficaces para aumentar la actividad inhibidora de ACE y ha sido identificado en muchos de los péptidos naturales inhibidores de la ACE (Quirós *et al.*, 2007; Pihlanto *et al.*, 2008; Contreras *et al.*, 2009). Esto sugiere que la actividad inhibidora de la ACE dependerá también del tipo de enzima utilizado para la hidrólisis. Alemán *et al.* (2011c) hidrolizaron gelatina de calamar con diferentes enzimas, siendo esta actividad muy diferente entre los distintos hidrolizados obtenidos, independientemente del grado de hidrólisis alcanzado.

#### **1.4.2. Actividad antioxidante**

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son moléculas altamente reactivas involucradas en la oxidación lipídica y la descomposición oxidativa de ácidos grasos insaturados (Qian *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010b).

En condiciones normales, las ERO y los radicales libres son eliminados eficazmente por sistemas de defensa antioxidante, tanto enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa) como no enzimáticos (vitamina E, vitamina C, glutatión). Sin embargo, en condiciones patológicas, se rompe el equilibrio entre la generación y eliminación de ERO, dando como resultado el deterioro de biomacromoléculas como el ADN, los lípidos de membrana y las proteínas. La generación incontrolada de radicales libres que atacan los lípidos de membrana, proteínas y ADN se cree que está implicada en muchos trastornos de la salud como diabetes mellitus, cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades inflamatorias y enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer (Qian *et al.*, 2008; Johansson *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010b). Por ello, el consumo de fuentes

antioxidantes externas resulta esencial para compensar las consecuencias perjudiciales del estrés oxidativo (Ratnam *et al.*, 2006).

Desde que el efecto antioxidante de los péptidos fue descrito por primera vez (Marcuse, 1960), se han realizado numerosos estudios investigando las propiedades antioxidantes de hidrolizados y péptidos obtenidos de fuentes vegetales y animales, tales como salvado de arroz (Revilla *et al.*, 2009), proteína de girasol (Megías *et al.*, 2008), proteína de hojas de alfalfa (Xie *et al.*, 2008), caseína (Suetsuna *et al.*, 2000), proteína de yema de huevo (Sakanaka *et al.*, 2004), proteína de músculo de caballa (Wu *et al.*, 2003), gelatina de túnica de calamar, gelatina de piel de pescado (Mendis *et al.*, 2005b), gelatina de piel bovina (Kim *et al.*, 2001b), huesos de columna vertebral de atún (Je *et al.*, 2007), proteínas liberadas en el agua de cocción del atún (Hsu *et al.*, 2009), etc. Debido a la enorme cantidad de desechos procedentes del procesado del pescado, se ha generado gran interés por la producción de hidrolizados y péptidos antioxidantes a partir de residuos colagenosos de diferentes especies de peces, tales como el abadejo de Alaska (*Theragra chalcogramma*) (Kim *et al.*, 2001b), merluza de cola (*Johnius belengerri*) (Mendis *et al.*, 2005b), cobia (*Rachycentron canadum*) (Yang *et al.*, 2008) y lenguado (Giménez *et al.*, 2009a); así como de varias especies de calamares, como el calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (Mendis *et al.*, 2005a; Giménez *et al.*, 2009a), jibia gigante (*Dosidicus eschrichtii* Streenstrup) (Lin & Li, 2006) o el calamar común japonés (*Todarodes pacificus*) (Nam *et al.*, 2008).

#### **1.4.3. Actividad hipoglucemiante**

En 1986 Nauck *et al.* (1986) observaron que la secreción de insulina en respuesta a la administración de glucosa por vía oral es mayor que la provocada por vía intravenosa, utilizando concentraciones plasmáticas de glucosa similares. A consecuencia de este experimento, se constató la hipótesis de que existen unas hormonas liberadas en el tracto gastrointestinal, denominadas incretinas, las cuales actúan sobre el páncreas y estimulan la producción de insulina, debido a lo cual disminuyen la glucemia. Estos

investigadores constataron que el grado de secreción de incretina dependía de la cantidad de glucosa ingerida y que las incretinas eran las responsables de aproximadamente el 75% de la respuesta de la insulina después de la ingesta de 50 gramos de glucosa (Chacra, 2006). Las dos principales hormonas incretinas son el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y el péptido-1 similar al glucagón tipo 1 (GLP-1).

Las hormonas GLP-1 son secretadas en las células L del íleon distal y el colon, mientras que las GIP son secretadas en las células K del duodeno y del yeyuno proximal y en menor medida a lo largo de todo el intestino delgado. Su función en el organismo es la de estimular la producción de insulina en el páncreas, hormona peptídica cuya principal función es la de regular los niveles de glucosa en la sangre (Norman & Litwack, 1997; Baggio & Drucker, 2007).

Las hormonas incretinas son secretadas en respuesta a la ingesta de alimentos ricos en glucosa, grasas o carbohidratos. El tiempo medio de vida de estas hormonas en el torrente sanguíneo es menor a dos minutos, ya que son rápidamente inactivadas por la enzima proteolítica dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV).

La dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV, EC 3.4.14.5) es una enzima expresada en la superficie de la mayoría de tipos de células, por lo que está presente en todo el organismo, y ejerce su actividad enzimática en el plasma donde preferentemente escinde péptidos con una Pro o una Ala en la posición 2 del extremo N-terminal de la cadena peptídica (McIntosh *et al.*, 2006; Duez *et al.*, 2012). Tanto la GLP-1 como la GIP, entre otras, son sustratos endógenos para la DPP-IV (ambas hormonas poseen una Ala en la posición 2 del extremo N-terminal), por lo que esta enzima es determinante en la acción de las incretinas. Es por estas características de la DPP-IV que últimamente se ha profundizado en la búsqueda de sustratos peptídicos, que por competición, inhiban la acción de la DPP-IV creando efectos antidiabéticos en el organismo (Baggio & Drucker, 2007). Gran parte de los inhibidores sintéticos han sido desarrollados en base al conocimiento de la especificidad de la enzima por el sustrato, por lo

que muchos de ellos son derivados de dipéptidos y como tales son compuestos de bajo peso molecular, con una buena biodisponibilidad oral (Deacon & Holst, 2006).

Varios inhibidores de la DPP-IV están en el mercado o en fase de pruebas, todos ellos con buenos resultados al inhibir la acción de la DPP-IV en plasma (Tabla 3).

**Tabla 3.** Inhibidores sintéticos de la DPP-IV

Compuesto	Compañía	Estado	Peso molecular (g/mol)	Actividad inhibidora de la DPP-IV (IC50) nM
<b>Sitagliptin (MK-0431)</b>	Merck	Comercializado en 2006	407.14	19
<b>Vildagliptin (LAF-237)</b>	Novartis	Comercializado en 2008	303.399	62
<b>Saxagliptin</b>	Bristol-Myers Squibb and Astra Zeneca	Comercializado en 2009; recientemente aprobada en Europa para el tratamiento de la DT2 con insuficiencia renal de moderada a severa o con insuficiencia hepática leve (2011)	315.41	50
<b>Alogliptin (SYR-322)</b>	Takeda	Comercializado en Japón	339.39	24
<b>Linagliptin (BI-1356)</b>	Boehringer-Ingelheim	Comercializado	472.54	1

Fuente: (Duez *et al.*, 2012)

En los últimos años se han publicado varios trabajos donde se obtienen hidrolizados y péptidos con capacidad inhibidora de la DPP-IV, tanto de proteínas de la leche (Tulipano *et al.*, 2011), como de gelatina de piel de salmón (Li-Chan *et al.*, 2012a), salvado de arroz (Hatanaka *et al.*, 2012), jamón curado (Gallego *et al.*, 2013), por citar algunos ejemplos.

#### 1.4.4. Actividad antimicrobiana

Una amplia gama de organismos eucariotas, desde las bacterias hasta el ser humano, poseen un mecanismo primitivo de defensa inmunológica. Los péptidos antimicrobianos proporcionan un método rápido y eficaz de defensa contra los patógenos. Generalmente, estos péptidos, o polipéptidos, contienen menos de 200 aminoácidos y son producidos por diferentes tipos de células se expresan de forma constitutiva o inducible dependiendo del organismo y del tejido en el que estén presentes en el momento de la infección, y tienen un amplio espectro antimicrobiano y múltiples mecanismos de acción (Schagger & Von Jagow, 1987; Reddy *et al.*, 2004).

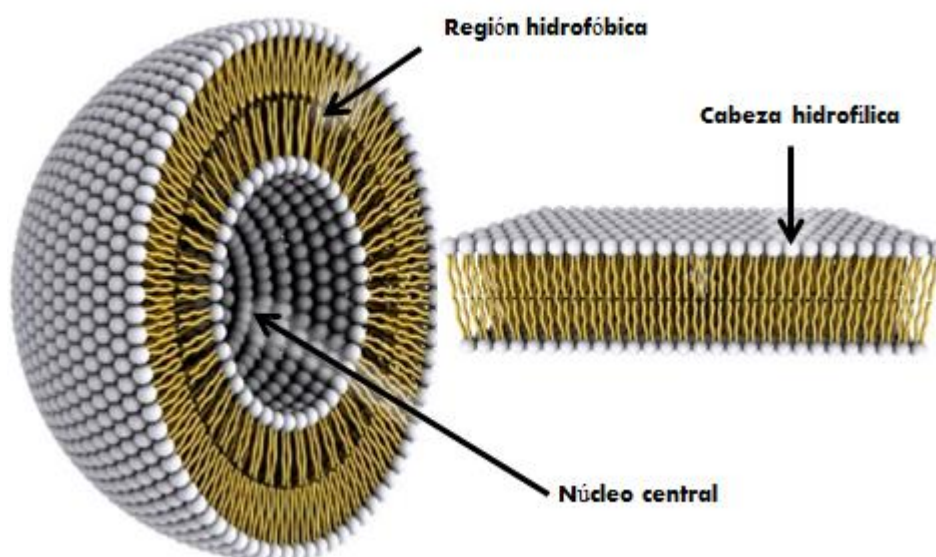
Estos péptidos presentan propiedades bactericidas, fungicidas, antivirales, antitumorales y comparten algunas características en común. La mayoría de estos péptidos son menores de 10 kDa, tienen una carga neta positiva, son hidrofóbicos e interaccionan con la membrana celular (Reddy *et al.*, 2004).

En los últimos años se ha incrementado este campo de investigación por su uso potencial en el ámbito clínico, ya que existen evidencias de que reducen la resistencia que el organismo genera contra los antibióticos (Brogden *et al.*, 2003; Téllez & Castaño, 2010). Así, se han descrito hidrolizados peptídicos con actividad antimicrobiana de diferentes fuentes proteicas, como caseína (Hayes *et al.*, 2006), hemoglobina bovina (Daoud *et al.*, 2005) y de especies acuáticas como gelatinas extraídas de túnica de calamar gigante y de piel de atún (Gómez-Guillén *et al.*, 2010) entre otras fuentes.



### 1.5. Nanoencapsulación de compuestos bioactivos en liposomas

Los liposomas son estructuras coloidales de forma esférica, formadas por una bicapa lipídica producto de la agregación de moléculas fosfolípídicas encapsulando un volumen de medio acuoso (Figura 11) (Jesorka & Orwar, 2008). Los fosfolípidos presentan propiedades anfifílicas ya que su molécula presenta un extremo hidrófilo y el otro extremo hidrófobo. Las interacciones hidrofóbicas entre ellos y las hidrofílicas con el agua provocan la formación de la bicapa (Nelson & Cox, 2005).



Fuente: (Bitounis *et al.*, 2012)

**Figura 11.** Liposoma

En los organismos vivos, los fosfolípidos son los principales componentes lipídicos de las membranas celulares. Hay que tomar en cuenta que todos los organismos vivos están compuestos de células y cada célula está cubierta por una membrana plasmática y el compuesto indispensable de esta membrana plasmática es una bicapa lipídica (Ottova & Tien, 2005). Aunque existe una amplia variedad de fosfolípidos, pudiéndose encontrar, por ejemplo, en una célula eucariota más de mil tipos diferentes, en las membranas plasmáticas de

organismos eucariotas el fosfolípido más abundante es la fosfatidilcolina. Sin embargo en organismos procariotas, por lo general este compuesto no está presente, siendo el fosfolípido predominante la fosfatidiletanolamina (Vance, 2003).

Los liposomas son semejantes a las membranas naturales y generalmente se obtienen a partir de uno o varios lípidos, los cuales son incorporados en un medio acuoso. Las moléculas fosfolípídicas forman agregados al intentar proteger sus secciones hidrofóbicas de las moléculas de agua, mientras siguen manteniendo contacto con la fase acuosa por medio de su extremo hidrofílico. Al proporcionar una cantidad adecuada de energía a los fosfolípidos agregados provoca la organización de las moléculas en bicapas cerradas. Durante este proceso, los solutos presentes en el medio acuoso son atrapados. Además, compuestos liposolubles pueden ser incorporados en la bicapa de los liposomas si se disuelven estos compuestos junto con los fosfolípidos de partida (Mozafari *et al.*, 2008a). Al contener los liposomas tanto una fase lipídica como una fase acuosa, pueden ser utilizados para la encapsulación, entrega y liberación de compuestos hidrosolubles, liposolubles y anfifílicos (Malheiros *et al.*, 2012). Entre los compuestos más comúnmente utilizados están la fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y colesterol (Jesorka & Orwar, 2008).

Los nanoliposomas son una versión nanométrica de los liposomas y su elaboración es una de las técnicas más utilizadas en sistemas de encapsulación y liberación controlada. El término nanoliposomas ha sido introducido exclusivamente para describir vesículas formadas por una bicapa lipídica con un rango de tamaños dentro de la escala nanométrica, por lo que “liposomas” es una terminología general que describe a diversas clases de vesículas con un rango de diámetros desde decenas de nanómetros a varios micrómetros. A pesar de que los nanoliposomas comparten las mismas propiedades químicas, estructurales y termodinámicas que los liposomas, al ser de menor tamaño, proveen una mayor superficie y tienen el potencial de incrementar la solubilidad, mejorar la biodisponibilidad y la liberación controlada

de sustancias, consiguiéndose una liberación de compuestos más precisa y en una mayor medida (Mozafari, 2010).

### **1.5.1. Caracterización de nanoliposomas**

La encapsulación de sustancias en nanosistemas lipídicos es una técnica cada vez más estudiada, especialmente como vehículos para fármacos y compuestos bioactivos (Jesorka & Orwar, 2008). Sin embargo se ha demostrado que el tamaño, la estabilidad y la eficiencia de encapsulación dependen de diversos factores, tales como el tipo de compuesto a encapsular, el tipo de lípido o las combinaciones de lípidos utilizados, el pH y el medio en el que se solubiliza el compuesto, así como el tipo y la intensidad de energía suministrada (Laridi *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008; da Silva Malheiros *et al.*, 2010; Honary & Zahir, 2012). La caracterización de liposomas es de gran importancia, ya que permite analizar si el producto obtenido es acorde a nuestras necesidades, o si es necesario cambiar algún parámetro para alcanzar o mejorar el objetivo buscado en el momento de encapsular un compuesto.

#### *1.5.1.1. Tamaño y polidispersidad de los liposomas*

El tamaño medio de las partículas, la distribución de tamaños y la polidispersidad de las suspensiones con liposomas generalmente son medidos mediante dispersión dinámica de luz (DLS). La microscopía electrónica de transmisión a temperatura criogénica (crio-TEM), microscopía electrónica de fractura por congelación, y dispersión cuasi-elástica de luz son métodos complementarios para determinar el diámetro medio, polidispersidad, y distribución del tamaños de liposomas (Jesorka & Orwar, 2008).

La dispersión dinámica de luz, también conocida como espectroscopia de correlación fotónica, es el más versátil y útil conjunto de técnicas para determinar los tamaños, distribución y en algunos casos la forma de nanopartículas suspendidas en un medio líquido (Pecora, 2000). La DLS mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas. El

movimiento browniano es el movimiento aparentemente aleatorio de las partículas suspendidas en un fluido (Harrison, 1985). Mientras más grande es la partícula, más lento será el movimiento browniano. El tamaño de la partícula es calculado a partir del coeficiente de difusión translacional usando la ecuación de Stokes-Einstein (Lee *et al.*, 2010a). Para determinar el movimiento browniano de las partículas, un haz de luz monocromática y coherente (láser) incide en medio de una solución diluida de macromoléculas. La luz choca con las partículas en movimiento y es dispersada por las mismas en todas las direcciones. Un detector (fotómetro) se encuentra orientado a cierto ángulo con respecto a la dirección de incidencia del haz de luz sobre la muestra. La intensidad detectada de la luz dispersada será ligeramente más alta o más baja que la de la luz incidente original (debido al efecto Doppler), dependiendo de la dirección en que se mueve la partícula con respecto al detector. Este cambio en la intensidad se relaciona con el movimiento browniano, y por ende con el tamaño de la partícula. Un correlador digital conjuntamente con un software específico generan la función de auto-correlación de la luz dispersada, y calculan el tamaño de la partícula (Goldburg, 1999; Frisken, 2001; Robles-Avila *et al.*, 2010).

Las dispersiones con nanopartículas por lo general contienen diversos tamaños de partícula, por lo que tienen diferentes coeficientes de difusión translacionales (Pecora, 2000). Al medir el tamaño de las partículas por DLS obtenemos un diámetro medio, la distribución de tamaños y el índice de polidispersidad que el software del equipo calcula mediante modelos matemáticos. Mediante el índice de polidispersidad se puede tener una idea de la diversidad de tamaños de partícula en la suspensión. El índice de polidispersidad es una medida adimensional que va de cero a uno, donde cero es el valor para partículas monodispersas (Zweers *et al.*, 2003).

#### 1.5.1.2. Eficiencia de encapsulación

La eficiencia de encapsulación (EE) es el porcentaje de compuesto que es incorporado dentro de la estructura lipídica. Aunque existen diversos métodos

para determinar la EE, la mayoría de ellos se basan en separar los liposomas del compuesto no encapsulado, para a continuación medir la concentración de compuesto en una o ambas partes.

En todos estos casos, la EE se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$EE = \left( \frac{CCE}{CN + CCE} \right) * 100$$

Dónde: EE = Eficiencia de encapsulación

CCE = Compuesto encapsulado

CN = Compuesto no encapsulado

Una de las técnicas utilizadas para conocer la eficiencia de la encapsulación consiste en separar el compuesto no encapsulado mediante **ultrafiltración**, utilizando filtros de centrífuga (Laridi *et al.*, 2003; da Silva Malheiros *et al.*, 2011). En este caso, se puede escoger el tamaño de poro del filtro, dependiendo del tamaño del compuesto que se ha encapsulado. De esta manera, el compuesto no encapsulado pasará a través de la membrana, y los liposomas quedarán retenidos. La ventaja de este método es la facilidad al momento de la separación; sin embargo, hay que realizar varios lavados a la membrana de corte, con el fin de asegurarse de que no quedan restos de compuesto no encapsulado en el retenido. Por otra parte, hay que tener en cuenta el volumen total de solvente que se utiliza en el proceso de lavado, con el fin de evitar errores al momento de determinar de forma cuantitativa el compuesto no encapsulado.

Otra técnica para separar los liposomas del compuesto no encapsulado, es mediante el uso de **columnas de exclusión por tamaño molecular** (técnica también conocida como filtración en gel), principalmente mediante el uso de la resina Sephadex® (Alexander *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). Esta resina compuesta por gel dextrano, es utilizada para purificar y separar moléculas de un amplio rango de tamaños moleculares. Cuando moléculas de diferente

tamaño pasan a través de la columna, las moléculas de menor tamaño son retenidas en las esferas que componen el gel, por lo que tardan más tiempo en pasar a través de la columna. Las moléculas de mayor tamaño, al no poder ingresar a los poros de la resina tienen que atravesar la columna recorriendo los espacios vacíos, por lo que son las primeras en salir de la columna. Las moléculas intermedias presentarán mayor o menor facilidad para recorrer a través del gel, dependiendo de su tamaño. Independientemente de la dispersión en tamaños de los liposomas, siempre serán eluidos antes que los péptidos libres, que no han sido incluidos eficientemente en el interior de los liposomas. Las resinas Sephadex pueden presentar diferentes tamaños de poro, por lo que al escoger el tipo de resina, es importante conocer el tamaño de los liposomas y del compuesto a encapsularse.

Otra técnica utilizada para determinar la eficiencia de encapsulación es mediante **espectroscopia de fluorescencia** (Were *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2007). En esta técnica, un haz de luz ultravioleta excita las moléculas de ciertos compuestos, lo que provoca una emisión de luz. En este caso se determina la intensidad de la fluorescencia, a determinadas longitudes de onda, que es directamente proporcional a la cantidad de moléculas excitadas. A continuación se procede a romper los liposomas con el fin de liberar el compuesto encapsulado, por lo general mediante el uso de un detergente (Tritón X-100). Se repite la medida sobre esta segunda solución, y se asume que la segunda concentración determinada corresponde al 100% del compuesto total. En este caso se utiliza la siguiente ecuación:

$$EE = \left( 1 - \left( \frac{CN}{CT} \right) \right) * 100$$

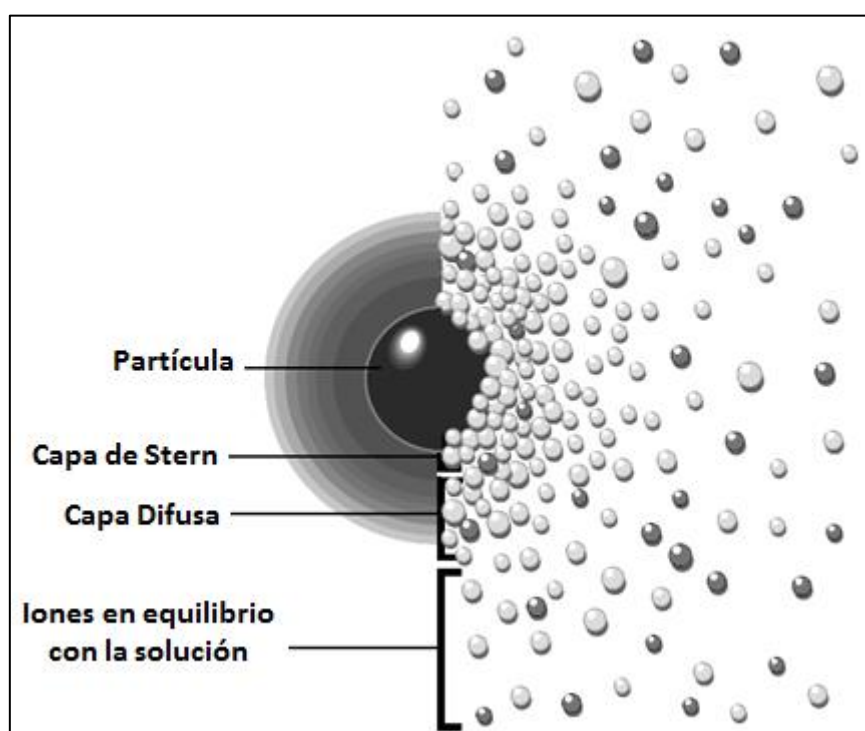
Dónde: EE = Eficiencia de encapsulación

CT = Compuesto total

CN = Compuesto no encapsulado

### 1.5.1.3. Potencial zeta

Cuando las partículas entran en contacto con una solución acuosa, desarrollan una carga eléctrica debido a sus características iónicas (interfase líquido-líquido). Cada una de estas partículas es rodeada por una capa de iones de carga opuesta pero equivalente a la de la partícula (capa de Stern). Este conjunto se encuentra envuelto por una capa difusa de iones de diferentes polaridades (Torrie & Valleau, 1986; Schultz *et al.*, 2008). El potencial eléctrico en la capa difusa disminuye exponencialmente a medida que aumenta la distancia desde la superficie de la partícula hasta llegar a cero. Esta porción de iones permanece ligado a la partícula durante todos sus desplazamientos en el medio acuoso, evitando colisiones con otras partículas de similares características y por tanto confiriendo estabilidad a la suspensión.



**Figura 12.** Potencial zeta de una partícula

El potencial zeta es el potencial electrostático que existe en el límite de la capa de Stern y la capa difusa (Figura 12) y es utilizado como índice de estabilidad

de las partículas (Hans & Lowman, 2002; Gustafsson *et al.*, 2003). Al incrementarse el potencial zeta (positiva o negativamente) se incrementan las interacciones repulsivas y se reduce la frecuencia de las colisiones entre partículas, dando lugar a una mayor estabilidad en la suspensión (da Silva Malheiros *et al.*, 2010).

Se han descrito valores de potencial zeta más positivos que +30 mV y más negativos que -30 mV para suspensiones físicamente estables, estabilizadas únicamente por repulsión electrostática. Sin embargo en el caso de suspensiones estabilizadas por medio de interacciones electrostáticas y estéricas es suficiente con valores de  $\pm 20$  mV (Müller *et al.*, 2001).

En la nanoencapsulación de compuestos en liposomas se ha descrito que tanto el uso de lípidos como péptidos polares inducen a una mayor repulsión electrostática entre las vesículas (Silva *et al.*, 2008; Moeller *et al.*, 2010; da Silva Malheiros *et al.*, 2011).

#### **1.5.2. Aplicaciones de los nanoliposomas en la industria alimentaria**

Los liposomas son ampliamente estudiados en farmacología y cosmética. En la industria alimentaria, aunque menos estudiados han sido utilizados en la encapsulación de proteínas, enzimas, vitaminas, antioxidantes, minerales, saborizantes y diversos compuestos bioactivos, ya que protegen al compuesto encapsulado contra radicales libres, iones metálicos, pH, temperatura, enzimas entre otros factores químicos y ambientales (Rao *et al.*, 1994; Shimoni, 2009; Fathi *et al.*, 2012). La empresa Healthy Items ([www.healthyitems.com](http://www.healthyitems.com)) comercializa diferentes suplementos nutricionales encapsulados en nanoliposomas, tales como vitamina C, complejo B, glutatión, curcumina, coenzima Q10, entre otros productos. En la página web estadounidense de Amazon ([www.amazon.com](http://www.amazon.com)) se pueden encontrar una amplia variedad de suplementos encapsulados en liposomas y nanoliposomas. Existen además diversos artículos científicos, en los cuales se ha estudiado la elaboración de quesos conteniendo diversos compuestos encapsulados en liposomas, tales como enzimas (Kheadr *et al.*, 2000) o péptidos antimicrobianos (Malheiros *et*



*al.*, 2012). Se ha utilizado también esta tecnología para prevenir la oxidación de grasas insaturadas en emulsiones utilizadas para untar, tales como margarinas o la mayonesa (Gibbs *et al.*, 1999).

La nanoencapsulación de compuestos funcionales puede aportar muchos beneficios a la industria alimentaria, y aunque existen numerosas investigaciones y productos orientados a la industria farmacéutica, cada vez es mayor el interés y las aplicaciones de esta tecnología en alimentos.

## 1.6. Películas comestibles como alimento funcional

En los últimos años, un creciente interés por el desarrollo de productos que reemplacen a los plásticos convencionales, principalmente por motivos medioambientales, ha generado la búsqueda de nuevos materiales biodegradables (Giménez *et al.*, 2013). En esta línea, las películas comestibles constituyen un producto novedoso, creadas principalmente para alargar la vida útil de los productos que recubren y están diseñados para consumirlas junto al producto (Rojas-Graü *et al.*, 2007). Para la elaboración de películas comestibles se utilizan materiales capaces de formar una matriz estructural, especialmente biopolímeros como proteínas y polisacáridos (Tharanathan, 2003; Gómez-Guillén *et al.*, 2009). También pueden estar diseñados para formar parte del producto como un diseño de *novel cousin*, o como un sistema de transporte de aromas, compuestos bioactivos, etc de tal manera que la película manifieste su efecto en la boca o en el intestino, según el compuesto que transporte.

A pesar de que las películas comestibles son productos con un alto valor añadido, que protegen a los alimentos principalmente por su barrera frente a la transmisión de oxígeno, luz y agua (Gennadios *et al.*, 1994), últimamente se está buscando incorporar nuevas características a este tipo de productos, así, se han descrito trabajos en los que incorporan péptidos antioxidantes o antimicrobianos en la formulación de materiales biopoliméricos, confiriéndoles el carácter de funcional a estos productos (Giménez *et al.*, 2009b; Cao-Hoang *et al.*, 2010; Gemili *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha descrito que la inclusión directa de compuestos bioactivos en las películas puede tener varias desventajas, como la liberación no controlada de los compuestos bioactivos o la interacción de los mismos con la matriz polimérica que se esté utilizando para elaborar la película (Martín-Belloso *et al.*, 2009). Una solución a este inconveniente podría ser la incorporación de estos compuestos, encapsulados en estructuras que no interaccionen con la matriz polimérica, y que permitan una liberación controlada del compuesto bioactivo. En ese sentido, (Imran *et al.*, 2012) incorporaron liposomas encapsulando el péptido antimicrobiano

Nisina en películas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), lo que evidencia la posibilidad de incorporar compuestos con otras actividades biológicas, en matrices poliméricas de distintos tipos.

***HIPÓTESIS***



Los pescados y mariscos representan una excelente fuente de nutrientes para una dieta equilibrada. Según la FAO, en 2009 este recurso aportó a la dieta humana el 16.6% de las proteínas de origen animal y el 6.5% del total de proteínas consumidas. Sin embargo esta cifra crece aceleradamente año a año al igual que los problemas asociados con los desechos generados por esta industria. Gran parte de estos subproductos (pieles, espinas, escamas, tejido conectivo) son fuente de péptidos potencialmente bioactivos.

A pesar de los estudios enfocados a la obtención de hidrolizados proteicos y péptidos bioactivos procedentes de fuentes alimenticias, son escasas las aplicaciones comerciales de estos productos.

La presente Memoria plantea que el aprovechamiento integral de subproductos generados por la industria de la pesca, aplicando tecnologías enzimáticas, podría ser una excelente forma de obtener productos de alto valor (péptidos y aminoácidos) que manifiesten propiedades bioactivas.

Además, mediante la protección de estos productos en nanovesículas lipídicas, se propone mejorar la estabilidad y funcionalidad de estos compuestos.

Existe la posibilidad de incorporar péptidos bioactivos encapsulados en sistemas alimentarios, obteniéndose productos potencialmente nutracéuticos. Por esto, se plantea incorporar las nanovesículas encapsulando los péptidos bioactivos obtenidos, escogiendo dos modelos de productos alimenticios para su posterior utilización en la industria alimentaria.



## ***OBJETIVOS***





El objetivo general de la presente Memoria ha sido la producción de fracciones peptídicas con actividad biológica a partir de residuos pesqueros, su encapsulación en nanoliposomas y la incorporación de éstos en dos sistemas alimenticios (gel de gelatina y película de caseína).

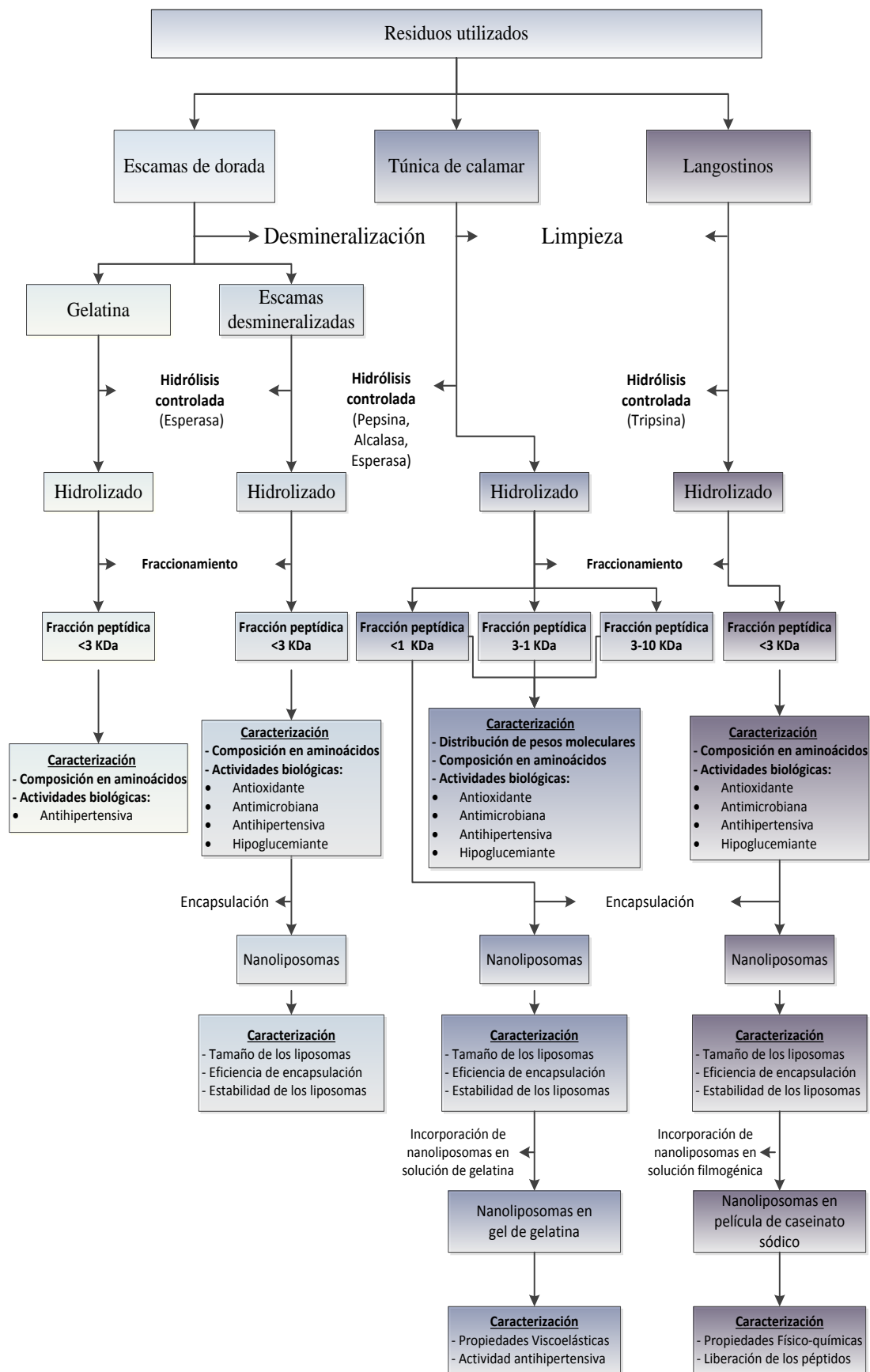
Para desarrollar dicho objetivo general se plantearon varios objetivos parciales:

1. Obtención, fraccionamiento y caracterización química de hidrolizados peptídicos procedentes de residuos de la industria pesquera, en concreto, gelatina o escamas desmineralizadas de dorada (*Sparus aurata*), túnicas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) liofilizadas o desecadas, y langostinos (*Penaeus notialis*) sin valor comercial.
2. Evaluación de la actividad biológica de las fracciones peptídicas: actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, actividad antihipertensiva por inhibición de la ACE (enzima convertidora de angiotensina I) y actividad hipoglucemiante por inhibición de la DPP-IV (dipeptidil-peptidasa IV).
3. Encapsulación de fracciones peptídicas en nanoliposomas de fosfatidilcolina y estandarización de las condiciones mediante la determinación de la eficiencia de encapsulación, diámetro medio y estabilidad de los liposomas.
4. Incorporación de nanoliposomas con péptidos antihipertensivos en un sistema de gelatina de pescado y evaluar las propiedades reológicas y potencialmente antihipertensivas del gel.
5. Incorporación de nanoliposomas con péptidos hipoglucemiantes y antihipertensivos en una película comestible de caseinato sódico y evaluar las propiedades físico-químicas y potencialmente funcionales de la película.



***DISEÑO EXPERIMENTAL***







## ***MATERIALES Y MÉTODOS***





## 5.1. Preparación de las muestras

### 5.1.1. Túnica de Calamar

Se utilizaron los restos de túnica procedente de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) generados por la empresa transformadora de pescado PSK Océanos S.A. (Pozuelo de Alarcón, Madrid, España), empresa importadora de América Latina. El calamar gigante fue capturado en las costas de Perú y desembarcado dentro de las primeras 24 horas tras su captura. Los individuos enteros fueron eviscerados y congelados, transportándose en contenedores a -18°C hasta España. A su llegada a fábrica, el calamar fue descongelado para su procesado (pelado y fileteado). Los restos de túnica interna fueron congelados a -18 °C en bloques de aproximadamente 20-30 kg y fueron transportados en estado congelado hasta la planta piloto del ICTAN-CSIC (Madrid, España).

Tras la recepción, los residuos de calamar se descongelaron a 0-2 °C durante 24 horas. A continuación se procesaron en una máquina Baader 694, (Alemania). El producto de este proceso, fue colocado en 6 partes de agua con NaCl al 5% durante 24 horas, con el fin de facilitar la eliminación de la proteína miofibrilar adherida mediante solubilización.

El lavado final de la túnica de calamar se llevó a cabo en una homogeneizadora (Stephan UM5, Stephan u Söhne GmbH & Co., Hameln, Alemania) acoplado el accesorio de palas amasadoras, utilizando la solución de 5% NaCl, durante 10 minutos, con el fin de terminar de eliminar pequeños restos de músculo adherido a la túnica. A continuación se lavó la túnica obtenida con agua y se escurrió en un tamiz.

Las túnicas limpias se separaron en 2 lotes, un lote se liofilizó, se envasó al vacío y se almacenó a -20 °C; el segundo lote se secó en una estufa con circulación de aire forzado (Binder, modelo FD 240, Tuttlingen, Alemania), a 45 °C durante 12 horas, se envasó al vacío y se almacenó a -20 °C.

### 5.1.2. Espinas y escamas de Dorada

Las espinas y escamas de dorada fueron obtenidas de una planta procesadora de dorada (*Sparus aurata*) (Culmarex, España). La mayor parte del tejido muscular fue removido de las espinas utilizando una máquina Baader 694, (Alemania). Las espinas limpias fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

Las escamas fueron lavadas con agua, con el fin de eliminar impurezas. Las escamas limpias fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

### 5.1.3. Desmineralización de las escamas

Las escamas descongeladas fueron tratadas dos veces con dos volúmenes de una solución de NaCl al 5% durante 30 minutos y con una solución de NaOH 0.1N durante una hora, con el fin de eliminar las proteínas no colagenosas. A continuación fueron tratadas tres veces con dos volúmenes de alcohol isobutílico al 10% durante 30 minutos, con el fin de eliminar cualquier residuo lipídico. Tras este proceso, las muestras fueron desmineralizadas sumergiéndolas en una solución de EDTA 0.5N durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua y se trataron con ácido acético 0.05M durante 3 horas. Finalmente las muestras se secaron en una estufa con aire forzado a 45 °C (Binder, modelo FD 240, Tuttlingen, Alemania) durante 12 horas y se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

### 5.1.4. Langostinos enteros

Langostinos (*Penaeus notialis*) congelados durante 6 años a -20 °C (sin valor comercial) fueron descongelados y lavados con agua fría. Las enzimas endógenas fueron inactivadas calentando los langostinos (previamente envasados al vacío) en un baño a 80 °C por 20 minutos. Los langostinos fueron triturados en un homogenizador Osterizer (Osterizer, Par Sunbeam, Mod. 867 50 E, USA). Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -20 °C para su posterior uso.

## **5.2. Gelatinas**

### **5.2.1. Extracción de Gelatina de espinas y escamas de Dorada**

Las escamas descongeladas fueron tratadas dos veces con dos volúmenes de una solución de NaCl al 5% durante 30 minutos y con una solución de NaOH 0.1N durante una hora, con el fin de eliminar las proteínas no colagenosas.

Con las espinas se probaron dos métodos para la eliminación de las proteínas no colagenosas de la muestra. En el primer caso las espinas fueron tratadas con HCl durante 18 horas (Bone-HCl). En el segundo caso las espinas fueron sometidas a hidrólisis con Alcalasa al 0.1% (p/p) durante 3 horas (Bone-Alc).

Posteriormente a este tratamiento (con HCl o Alcalasa), tanto las escamas como las espinas fueron tratadas tres veces con dos volúmenes de alcohol isobutílico al 10% por 30 minutos, con el fin de eliminar cualquier residuo lipídico. A continuación las muestras fueron desmineralizadas sumergiéndolas en una solución de EDTA 0.5N durante toda la noche. Seguidamente se lavaron con agua y se trataron con ácido acético 0.05M durante 3 horas en el caso de las escamas y durante 21 horas en el caso de las espinas.

La extracción final se llevó a cabo con agua destilada a 60 °C durante toda la noche. Los extractos fueron filtrados a través de una gasa y secados a 45 °C durante toda la noche en una estufa con circulación de aire forzado (Binder, modelo FD 240, Tuttlingen, Alemania).

La gelatina comercial LAPI, obtenida principalmente a partir de piel de pez gato, fue suministrada por LAPI Gelatine (ESPOLI, Florencia, Italia).

### **5.2.2. Propiedades gelificantes**

Las propiedades gelificantes fueron evaluadas en las gelatinas extraídas a partir de espinas y escamas de dorada, así como en la incorporación de nanoliposomas en gelatina comercial LAPI.

#### *5.2.2.1. Propiedades viscoelásticas*

Las propiedades viscoelásticas se determinaron en un reómetro rotatorio de esfuerzo controlado Bohlin CRS-10 (Bohlin Instruments Ltd., Gloucestershire, UK) usando una geometría cono-plato (ángulo de cono 4°, distancia entre placas de 0.15 mm). Las soluciones fueron preparadas disolviendo la gelatina seca en agua destilada (6.67%, w/v) a 40° C por 15-20 minutos. El barrido dinámico de temperatura se realizó a una velocidad de barrido de 1° C por minuto, una frecuencia de 0.5 Hz, estrés inicial de 3 Pa y una deformación de 0.2. El módulo elástico ( $G'$ ), módulo viscoso ( $G''$ ) y el ángulo de fase ( $\delta$ ) fueron evaluados en función de la temperatura. Las rampas de temperatura fueron implementadas desde 35 a 5° C y de vuelta a 35° C para estudiar la gelificación de la gelatina y su posterior fusión.

Por otra parte, un barrido dinámico de frecuencia fue realizado a 4° C mediante amplitud de oscilación dentro de la región lineal ( $\gamma=0.005$ ) sobre el rango de frecuencia de 0.1-10Hz. Tanto el módulo elástico como el módulo viscoso se representaron gráficamente como función de la frecuencia. Para caracterizar la dependencia de la frecuencia de  $G'$  sobre el rango de frecuencia limitado, se utilizó la ley de potencia:

$$G' = G_0' \omega^n$$

Donde  $G_0'$  es la energía almacenada y recuperada por ciclo de deformación sinusoidal a una frecuencia angular de 1 Hz,  $\omega$  es la frecuencia angular y  $n$  es el exponente de la ley de la potencia; el cual es cercano a cero cuando los geles exhiben un comportamiento elástico ideal.

#### *5.2.2.2. Fuerza del gel*

La fuerza del gel formado fue determinada según la técnica descrita por (Gómez-Guillén *et al.*, 2002) en un texturómetro Texture Analyzer TA.XT.plus (SMS, Surrey, UK), velocidad de la célula de carga de 1 mm/s, equipado con un émbolo cilíndrico de cara plana de 1.27 cm de diámetro, usando geles al 6.67% (w/v) formados al disolver gelatina seca en agua destilada a 45° C y

enfriada a 7° C (temperatura de maduración) por 16-18 horas. La fuerza del gel fue determinada a 7° C usando muestras de 3.6 cm de diámetro y 3.6 cm de grosor y se expresó como la fuerza máxima (en g) obtenida cuando el émbolo penetró 4 mm el gel. Los datos representan la media de al menos 5 determinaciones.

### 5.3. Hidrólisis enzimática

#### 5.3.1. Hidrólisis de túnica de calamar

Las túnicas secas y liofilizadas se sometieron a hidrólisis con diferentes enzimas solas o aplicándolas consecutivamente: pepsina (pepsina de mucosa estomacal porcina, Sigma-Aldrich), Alcalasa (proteasa de *Bacillus licheniformis*, Sigma-Aldrich) y Esperasa (proteasa de *Bacillus* sp. Novozymes). Se fijaron las condiciones más idóneas de temperatura, pH, tiempo de hidrólisis y relación enzima-sustrato (Tabla 4). Las hidrólisis se llevaron a cabo en un pH-stato (TIM 856, Radiometer analytical, Villeurbanne, France). El pH se mantuvo constante mediante la adición de ácido cítrico 0.1 N e hidróxido de sodio 0.1 N, ambos de Panreac (Barcelona, España).

**Tabla 4.** Condiciones de hidrólisis enzimáticas

	pepsina	Alcalasa	Esperasa
Temperatura (°C)	37	60	60
pH	2	8	8
Tiempo de hidrólisis (h)	5	3	3
Relación enzima-sustrato (w/w)	1:100	1:100	1:50

Tras la hidrólisis, se inactivaron las enzimas calentando la muestra a 90 °C durante 10 minutos y posteriormente centrifugándola a 3800 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Heaerus Labofuge 400, DJB Labcare, Bucks, UK). Los sobrenadantes fueron liofilizados y almacenados a -80 °C.

### **5.3.2. Hidrólisis de gelatina y escamas desmineralizadas de dorada**

Tanto la gelatina de escamas como las escamas desmineralizadas se sometieron a hidrólisis enzimática utilizando Esperasa con una relación enzima-sustrato de 1:50 (w/w) durante 3 horas a pH 8 y 60 °C. El pH de la reacción se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 1N usando un pH-stato (TIM 856, Radiometer analytical, Villeurbanne, France). Tras la hidrólisis, se inactivaron las enzimas calentando la muestra a 90 °C durante 10 minutos y a continuación se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 4 °C (Heaerus Labofuge 400, DJB Labcare, Bucks, UK).

### **5.3.3. Hidrólisis de langostinos**

Los langostinos triturados y homogenizados fueron mezclados con buffer fosfato 0.07 M pH 8 (1:5, w/v). La suspensión fue calentada a 38 °C. La hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando tripsina (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) con una relación enzima-sustrato de 1:00 (w/w) durante 90 minutos a pH 8 y 38 °C. El pH de la reacción se mantuvo constante mediante la adición de NaOH 1N usando un pH-stato (TIM 856, Radiometer analytical, Villeurbanne, France). Tras la hidrólisis, se inactivaron las enzimas calentando la muestra a 90 °C durante 20 minutos y luego centrifugándola a 3000 rpm durante 15 minutos y 4 °C (Heaerus Labofuge 400, DJB Labcare, Bucks, UK).

## **5.4. Fraccionamiento**

Los hidrolizados producidos a partir de túnicas liofilizadas de calamar fueron fraccionados mediante ultrafiltración tangencial. Para ello, se utilizaron membranas de peso molecular nominal límite {molecular weight cut-off (MWCO)} de 10, 3 y 1 kDa (Omega, Centramate<sup>TM</sup> cassette medium screen channel, Pall Corporation, Madrid, España).

Los hidrolizados de gelatina de escamas, escamas desmineralizadas, y langostinos fueron fraccionados mediante el uso de filtros de ultrafiltración con un peso molecular nominal límite (MWCO) de 3 kDa (Macrosep<sup>®</sup> Centrifugal Devices 3K, Pall Corporation, NY, USA).



Tras la ultrafiltración, las fracciones obtenidas fueron liofilizadas y conservadas a -80 °C.

#### **5.4.1. Determinación del tamaño molecular de hidrolizados y fracciones peptídicas**

Para determinar el tamaño molecular de los hidrolizados, se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida al 16.5%, de acuerdo con el método descrito por Schagger y Von Jagow (1987) (Schagger & Von Jagow, 1987). Los hidrolizados fueron disueltos (20 mg/mL) en el tampón de carga (50 mM Tris-HCl, SDS al 4%, 12% de glicerol, 2% mercaptoetanol y 0.01% de azul de bromofenol) y la temperatura de desnaturalización fue de 90° C durante 10 min. La electroforesis se llevó a cabo en una unidad Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). El volumen de carga fue de 10 µL en todos los carriles. Las bandas de proteínas se tiñeron con azul de Coomassie R250 brillante. El peso molecular aproximado de los hidrolizados se determinó usando un patrón de 2 a 250 kDa (Precision Plus Protein Dual Xtra Standards, BIO-RAD).

Para determinar tamaños moleculares más pequeños, las muestras fueron evaluadas por exclusión molecular en cromatografía líquida de alta resolución (SEC-HPLC; modelo SPE MA10AVP, Shimadzu, Kyoto, Japón) mediante una columna Superdex para péptidos PC 3.2/30 (GE Healthcare Bio-Sciences, Barcelona, España), con un rango de fraccionamiento entre 7000 y 100 Da. El volumen de inyección fue de 10 µL y el flujo fue de 0.1 mL / min. Como fase móvil se utilizó agua Milli-Q. La vitamina B12 (1355 Da) y el compuesto hipuril-l-histidil-l-leucina (HHL, 502 Da), ambos de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EE.UU.), fueron utilizados como patrones de peso molecular.

## 5.5. Propiedades bioactivas de los hidrolizados

### 5.5.1. Determinación de la actividad antioxidante

La capacidad para secuestrar radicales libres se determinó mediante el método del ABTS (ácido 2'2-azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-sulfónico) descrito por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones (Re *et al.*, 1999). Se preparó una solución madre de radical ABTS (7 mM de ABTS en persulfato de potasio 2.45 mM), que se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas. Se diluyó una alícuota de esta solución madre en agua destilada hasta alcanzar una absorbancia de 0.70 ( $\pm 0.02$ ) a una longitud de onda de 734 nm (solución de trabajo). Se tomó una alícuota de 20  $\mu$ L de muestra y se mezcló con 980  $\mu$ L de la solución de trabajo, incubándose a 37° C durante 10 minutos en la oscuridad. Finalmente se determinó la disminución de la absorbancia a 734 nm. Se construyó una curva estándar con vitamina C, que relaciona la concentración de vitamina C con la disminución de absorbancia causada por la misma. Los resultados se expresaron como mg de vitamina C Eq/g de proteína, determinada mediante análisis de aminoácidos. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### 5.5.2. Determinación de la actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva se determinó mediante la capacidad de las muestras para inhibir la enzima ACE. La actividad inhibidora de la ACE se evaluó por medio de cromatografía líquida alta resolución en fase reversa (RP-HPLC modelo SPE-MA10AVP Shimadzu, Kyoto, Japón), utilizando una columna C18 (Tracel sobresalen 120 ODSA 5 micras de 25 x 0.46, Teknokroma, Barcelona, España). El método utilizado fue descrito por Wu, Aluko y Muir (2002) con algunas modificaciones (Wu *et al.*, 2002). Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado. Los resultados se expresaron como valor IC<sub>50</sub> que se define como la concentración de proteína (mg/mL) requerida para reducir el pico de HA (ácido hipúrico) en un 50% (50% de inhibición de la actividad de la enzima).

### 5.5.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las fracciones peptídicas se realizó sobre 26 cepas de microorganismos de colección de acuerdo al método descrito por Gómez-Guillén *et al.* (2010)(Gómez-Guillén *et al.*, 2010). Las cepas y condiciones de cultivo se muestran en la Tabla 5. Los microorganismos se almacenaron a -80 °C en caldo infusión cerebro corazón, BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) con 25% de glicerol (Panreac, Barcelona, España) hasta su utilización.

La medida de la actividad antimicrobiana se realizó en placas de agar, las cuales se inocularon en superficie con 100 µL de los cultivos microbianos incubados durante la noche (~ 10<sup>6</sup> UFC/mL). El medio de cultivo utilizado para todas las cepas fue BHI agar, a excepción de *P. phosphoreum* (BHIA suplementado con 1% de NaCl), *D. hansenii* y *V. parahaemolyticus* (BHIA suplementado con 3% NaCl), *L. acidophilus* (MRS agar) y *A. niger* y *P. expansum* (agar potato). A continuación se impregnaron discos de papel de filtro (0.5 cm de diámetro) con 40 µL de cada fracción peptídica (4 mg /mL en agua). Estos discos se colocaron en la superficie de cada placa y se incubaron en las mismas condiciones de temperatura utilizadas para el cultivo.

La zona clara (halo) que rodea los círculos (zona de inhibición) se consideró como una medida de la actividad antimicrobiana. La medida de las zonas de inhibición se realizó con un software específico para el análisis digital de imágenes (MIP 4 ADV, Consulting de Imagen Digital, S.L. & Microm, España), en el que se establece la diferencia entre el diámetro de la zona de inhibición y el diámetro del disco, expresado de acuerdo a la siguiente clasificación: +++: > 1 cm; ++ ≥ 0.5 cm, +: 0.25-0.5 cm, ±: <0.25 cm and -: 0.1 cm.

**Tabla 5.** Cepas microbianas y condiciones de crecimiento

Microorganismo	Certificado	ID	Medio de cultivo	Tº Incubación ( °C)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CECT 839T	AH	BHI	30
<i>Aspergillus niger</i>	CECT 2088	AN	BHI	30
<i>Bacillus cereus</i>	CECT148	BC	BHI	37
<i>Bacillus coagulans</i>	CECT 56	Bcoag	BHI	37
<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>subsp.lactis</i>	DSMZ 100140	BA	BHI	* AN 37
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSMZ 20215	BB	BHI	* AN 37
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	CECT 847	BT	BHI	20
<i>Citrobacter freundii</i>	CECT 401	CF	BHI	37
<i>Clostridium perfringens</i>	CECT 486	CP	BHI	* AN 37
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CECT 11364	DH	BHI (3% CNa)	20
<i>Enterococcus faecium</i>	DSMZ 20477	EF	BHI	37
<i>Escherichia coli</i>	CECT 515	EC	BHI	37
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	CECT 903	LA	MRS	**CO <sub>2</sub> 30
<i>Lactobacillus helveticus</i>	DSMZ 20075	LH	BHI	37
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	LI	BHI	37
<i>Listeria monocytogenes</i>	CECT 4032	LM	BHI	37
<i>Penicillium expansum</i>	DSMZ 62841	PE	BHI	30
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	CECT 4192	PP	BHI (1% CNa)	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CECT 110	PA	BHI	30
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CECT 4898	PF	BHI	30
<i>Salmonella choleraesuis</i>	CECT4300	SC	BHI	37
<i>Shewanella putrefaciens</i>	CECT 5346T	SP	BHI	30
<i>Shigella sonnei</i>	CECT 4887	SS	BHI	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	CECT 240	SA	BHI	37
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CECT 511T	VP	BHI (3% CNa)	37
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CECT 4315	YE	BHI	37

\* Incubado bajo condiciones de anaerobiosis

\*\* Incubado con flujo de CO<sub>2</sub>

#### 5.5.4. Determinación de la actividad hipoglucemiante

La actividad inhibidora de la enzima dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) fue determinada de acuerdo al método descrito por (Tulipano *et al.*, 2011) con ligeras modificaciones. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos.

Brevemente, se incubaron 10  $\mu$ L de DPP-IV (previamente diluido en tampón Tris HCl 100 mM, pH 8) a diferentes concentraciones de muestra (volumen final de 300  $\mu$ L por pocillo) a 37 °C durante 15 min. La muestra se diluyó previamente en tampón Tris HCl 100 mM a pH 8. La reacción se inició tras la adición de 100  $\mu$ L de tampón de ensayo que contenía un sustrato cromogénico (H-Gly-Pro-AMC · HBr) a una concentración final de 25  $\mu$ M. El cambio en la fluorescencia a 355 nm/460 nm se monitorizó a intervalos de 2 minutos durante 30 minutos en un lector de placas Appliskan multimodo (Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.). Los datos obtenidos se graficaron en función del tiempo. La actividad inhibidora se calculó a partir de los datos obtenidos en ausencia o en presencia de la muestra de ensayo a diferentes concentraciones. Se utilizó una regresión logarítmica para calcular el valor de IC<sub>50</sub>, es decir, la concentración de la fracción peptídica necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la DPP-IV.

## **5.6. Composición química**

### **5.6.1. Humedad y cenizas**

El contenido de humedad y el contenido de cenizas de las gelatinas de espinas y escamas se determinaron según los métodos oficiales AOAC 934.01 y 942.05 respectivamente.

### **5.6.2. Minerales**

La cantidad de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en las gelatinas de hueso y escamas se determinó mediante espectrometría de absorción atómica (Modelo 5100, Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, USA). El contenido de minerales se expresó en mg/100 g de gelatina.

### **5.6.3. Proteínas**

El contenido de proteína de cada gelatina y del colágeno de escamas fue determinado según el contenido en nitrógeno de las mismas, usando como factor de conversión nitrógeno-proteína 5.4. El nitrógeno se determinó en un analizador de nitrógeno/proteína LECO FP-2000 (Leco Corp., St. Joseph, Mi, USA).

### **5.6.4. Composición de aminoácidos**

Las diferentes fracciones obtenidas por ultrafiltración fueron disueltas en agua Milli-Q a una concentración de 1 mg/mL. Alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra fueron desecadas y sometidas a hidrólisis ácida mediante HCl 6 N con fenol (0.1%), durante 24 horas a  $110 \pm 2^\circ \text{C}$  en tubos de vidrio sellados a vacío. La norleucina (Sigma-Aldrich, INC., St. Louis, MO, USA) se utilizó como estándar interno. Tras la hidrólisis ácida, las muestras se secaron a vacío, se disolvieron en el buffer de aplicación, y se inyectaron en un analizador de aminoácidos Biochrom 20 (Pharmacia, Barcelona, España).

## **5.7. Encapsulación en nanoliposomas de fosfatidilcolina**

### **5.7.1. Purificación de fosfatidilcolina a partir de lecitina cruda de soja**

10 gramos de lecitina cruda de soja fueron disueltos en 50 mL de acetato de etilo. Luego se añadieron 2 mL de agua destilada lentamente bajo agitación, dando como resultado la formación de dos fases. La parte superior fue separada de la parte inferior y se descartó. La fase inferior que presentó el aspecto de un gel, fue mezclada con 30 mL de acetona, formando grumos, que fueron triturados con una varilla de agitación. A continuación se retiró la acetona por decantación y una nueva alícuota de 30 mL de acetona se añadió al producto obtenido, repitiéndose el proceso anterior. Finalmente, el precipitado se filtró al vacío y se colocó en un desecador durante 24 horas para eliminar los restos de solvente.

### **5.7.2. Producción de liposomas por el método de hidratación de la película**

El método de hidratación de la película fue realizado de acuerdo al protocolo descrito por (Pinnaduwege & Bruce, 1996) con ciertas modificaciones. Se disolvió fosfatidilcolina en cloroformo (1.5-4.5% w/v) en un balón de destilación de fondo redondo y se eliminó el solvente usando un evaporador rotatorio hasta que una fina película se hubo formado en las paredes del recipiente. Las trazas restantes de solvente fueron eliminadas mediante el almacenamiento de los balones por 18 horas en un desecador con vacío. En la película lipídica resultante se añadió 5 mL de buffer fosfato (10mM) a pH7 conteniendo las fracciones peptídicas a encapsular. Las mezclas resultantes fueron agitadas en un vórtex por encima de su temperatura de transición de fase (60° C) con el fin de producir vesículas lipídicas multilamelares (MLVs). La sonicación de la solución obtenida (con el fin de reducir y homogenizar el tamaño de los liposomas) se llevó a cabo en un disruptor celular ultrasónico (Unique, Brasil; **capítulo 6.3**) (Model Q700, Qsonica sonicators, Newton, CT, USA; **capítulo 6.4**), en el cual las MLV fueron expuestas a cinco ciclos de sonicación de un

minuto cada uno con intervalos de descanso de un minuto para evitar el sobrecalentamiento de la muestra.

### **5.7.3. Producción de liposomas por el método de calentamiento**

El método de calentamiento fue realizado de acuerdo al protocolo descrito por (Mozafari *et al.*, 2002) con varias modificaciones. La fosfatidilcolina parcialmente purificada fue triturada en un mortero de porcelana y tamizada utilizando un tamiz de rejilla metálica con un diámetro de poro de 0.2 mm. Se disolvieron 0.5 g de la fracción peptídica junto a 5 g de fosfatidilcolina en 20 mL de tampón fosfato 10mM pH 7 con leve agitación. La mezcla se calentó durante 1 hora a 80 °C en un baño. A continuación se agregaron 15 mL de tampón fosfato y 5 mL de glicerol<sup>1</sup>. La muestra se mezcló con leve agitación y se calentó en baño a 80 °C durante una hora. Posteriormente se agitó en vórtex durante 5 minutos y se sometió a sonicación en un disruptor celular ultrasónico (Model Q700, Qsonica sonicators, Newton, CT, USA), 5 ciclos de sonicación con descansos de 1 minuto en un baño con hielo. Finalmente se añadieron 60 mL de tampón fosfato 10 mM pH 7, y se repitió el tratamiento de sonicación.

### **5.7.4. Caracterización de los liposomas**

El tamaño de los liposomas y el índice de polidispersidad se determinaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) en un equipo Brookhaven Instruments (goniómetro BI-200M, correlador digital BI-9000AT). El potencial zeta de los liposomas se determinó usando un equipo Zetasizer nano-ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, Herrenberg, Alemania).

---

<sup>1</sup> Normalmente se utilizan 3 mL de fosfatidilcolina, sin embargo en este caso, se agrega glicerol adicional debido a que esta solución se utilizará en la formulación de películas comestibles de caseinato sódico, donde el glicerol adicional fue calculado en base a los requerimientos de la solución filmogénica.



#### 5.7.5. Eficiencia de encapsulación

Para determinar la eficiencia de encapsulación se utilizó el método de filtración por Sephadex con el fin de separar los compuestos libres de los encapsulados. Una columna de vidrio (350 mm de altura por 7 mm de diámetro) fue rellena da con 8 mL de resina Sephadex® G-100 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Como fase móvil se utilizó tampón fosfato 10mM a pH 7. Se colectaron fracciones de 0.5 mL. Para determinar la eficiencia de encapsulación se determinó el contenido de proteína en cada una de las fracciones recogidas por el método desarrollado por Lowry *et al.* (1951). Los datos obtenidos fueron analizados con el programa informático Origin 8SR0 versión 8.0724 (OriginLab Corporation, Northampton, MA 01060 EUA). Se determinaron las áreas de las curvas correspondientes al compuesto libre y al compuesto encapsulado.

La eficiencia de encapsulación se calculó usando la siguiente ecuación:

$$EE = \left( \frac{\text{área compuesto libre}}{\text{área compuesto libre} + \text{área compuesto encapsulado}} \right) * 100$$

#### 5.7.6. Estabilidad de los liposomas a diferentes pH

Se disolvieron 10 µL de la solución liposomal en 10 mL de tampón y se almacenó a 4° C. Se utilizaron tampones de pH entre 1 y 8. Tras 24 horas se evaluó el potencial zeta en cada una de las muestras.

#### 5.7.7. Incorporación de liposomas en gel de gelatina

Una gelatina comercial, principalmente obtenida a partir de pieles de pez gato (GAL/ F15-25), fue obtenida de la empresa Lapi Gelatin S.P.A. (Empoli, Florence, Italy). Una concentración de 6.67% de gelatina se disolvió en la solución liposomal a diferentes concentraciones (entre 10 y 100% de la solución liposomal diluida en tampón fosfato 10mM, pH7, lo que representa entre 2.62 y 26.24 mg de la fracción peptídica por gramo de gelatina seca).

#### 5.7.7.1. *Caracterización de los geles de gelatina*

Las propiedades viscoelásticas de los geles se determinaron de acuerdo al método descrito en el apartado 5.2.2.1.

La transmitancia óptica se determinó utilizando un espectrofotómetro (Modelo CPS-240, Shimadzu, Kyoto, Japón) en un rango de longitudes de onda entre 200 y 700 nm.

Para determinar el color de los geles se utilizó un colorímetro Konica Minolta CM-3500d (Konica Minolta, Madrid, España). Se tomaron 5 medidas en diferentes zonas del gel y cada valor descrito representa la media de al menos 11 medidas.

#### 5.7.8. **Incorporación de liposomas en películas de caseinato sódico**

Para la elaboración de las películas, se disolvió 8 g de caseinato de sodio en 100 mL de tampón fosfato pH 7 10 mM. A continuación la mezcla se sometió a 5 ciclos de sonicación de un minuto cada uno, con intervalos de 1 minuto de descanso en un disruptor celular ultrasónico (Model Q700, Qsonica sonicators, Newton, CT, USA). 12.5 mL de esta solución se mezclaron con 7.5 mL de la solución de liposomas obtenidos mediante el método de calentamiento. La mezcla obtenida se colocó en una placa de 11.5 x 11.5 cm, y se secó en una estufa de aire forzado (Binder, modelo FD 240, Tuttlingen, Alemania), durante 12 horas.

##### 5.7.8.1. *Caracterización de las películas*

El contenido de humedad se determinó según el método oficial AOAC 934.01

La solubilidad fue determinada según una modificación de la técnica descrita por Gontard *et al.* (1992). Secciones de 2x2 cm fueron colocadas en cápsulas de aluminio (7cm de diámetro) con 15 mL de agua destilada durante 15 horas a 22 °C. El contenido se filtró a través de un papel filtro Whatman Nº 1 (Whatman International Ltd., Maidstone, UK) con el fin de recuperar los restos de película

no solubilizada, los mismos que fueron desecados a 105 °C durante 24 horas. La solubilidad de la película fue calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$S(\%) = \frac{(W_o - W_f)}{W_o} \times 100$$

Donde:  $W_o$  es el peso inicial de la película expresado como materia seca y  $W_f$  es el peso seco de los restos de película desecados.

El espesor de las películas se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Pérez Mateos *et al.* (2009). Utilizando un micrómetro (MDC-25M, Mitutoyo, Kanagawa, Japón), se tomaron 6 medidas en cada película, en diferentes zonas de la película, al azar, presentando el resultado como el promedio de las 6 medidas.

La transparencia de las películas se determinó de de acuerdo a la técnica descrita por Pérez Mateos *et al.* (2009). Las medidas se realizaron a 600 nm utilizando un espectrofotómetro (Modelo CPS-240, Shimadzu, Kyoto, Japón).

#### **5.7.9. Análisis de la morfología de los liposomas**

La morfología de los liposomas y las películas con liposomas fue analizada mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET).

El microscopio electrónico de transmisión utilizado fué un JEOL JEM-1010 (JEOL, Tokio, Japón), con un potencial de 100 kV y un potencial de trabajo de 80 kV. Las fotografías fueron realizadas con una cámara CCD y procesadas mediante el programa informático Soft Imaging Viewer.

##### **5.7.9.1. Preparación de los liposomas para el análisis**

Los liposomas fueron analizados por tinción negativa. Se diluyeron 100 µL de la suspensión de nanoliposomas en 10 mL de agua destilada. Una gota de esta solución fue colocada sobre papel de parafilm. Encima de la gota se colocó una rejilla de cobre (200 mesh) cubierta de grafito durante 5 minutos. Por último, se coloca la rejilla en una solución al 2% de Acetato de uranilo durante 20

segundos. Una vez teñida la muestra, se coloca en un portarejillas para su posterior análisis.

#### *5.7.9.2. Preparación de las películas para el análisis*

Las películas fueron fijadas en una solución de glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 4% disueltas en tampón fosfato 0.1M pH 7 durante 2 horas. A continuación las muestras fueron lavadas con agua destilada. La post-fijación se realizó con tetróxido de osmio al 1%. Las muestras se deshidrataron con acetona, se embebieron en resina Epon 812 y se secaron a 200° C. Se cortaron secciones ultrafinas de muestra usando un ultramicrotomo (LKB Bromma 2088, Suiza), se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y se colocaron en un portarejillas para su posterior análisis

### **5.8. Análisis estadístico**

El análisis estadístico fue realizado por medio del programa informático de análisis de datos STATGRAPHICS Centurion XV (StatPoint, Inc.). Las diferencias significativas fueron determinadas según el procedimiento de comparación múltiple de Duncan con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## ***TRABAJO EXPERIMENTAL***



**ESPINAS Y ESCAMAS DE DORADA (*Sparus aurata*) COMO  
FUENTE DE GELATINA Y DE PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD  
ANTIHIPERTENSIVA**





### **6.1.1. Resumen**

Se estudiaron las escamas y espinas de dorada (*Sparus aurata*) como fuente de gelatina. De las escamas se obtuvieron mayores rendimientos que de las espinas pre-tratadas con HCl o Alcalasa. La desmineralización con EDTA fue efectiva, especialmente en el caso de la gelatina de escamas, la cual mostró el menor contenido de minerales. Adicionalmente, el pre-tratamiento de las espinas con HCl dio lugar a un incremento en la desmineralización. La fuerza del gel y las propiedades viscoelásticas de la gelatina de escamas fueron mayores que las de las gelatinas de espinas, y solo se encontraron pequeñas diferencias entre las gelatinas extraídas de las espinas pretratadas con HCl o Alcalasa. El perfil de aminoácidos fue similar en las tres gelatinas. La calidad de la gelatina de escamas, en términos de fuerza de gel, fue incluso mayor que la de una gelatina bovina comercial utilizada con fines comparativos. Cuando la gelatina de escamas fue sometida a hidrólisis enzimática con Esperasa, se encontró una alta actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) en la fracción peptídica menor de 3 kDa, siendo la cantidad requerida para inhibir el 50% de la actividad ACE (IC<sub>50</sub>) de 60 µg/mL.

### 6.1.2. Introducción

Los residuos generados por el procesado de pescado después del fileteado, pueden alcanzar hasta un 75% del peso total de las capturas. Alrededor del 30% de estos residuos son pieles, espinas y escamas, materiales con un alto contenido de colágeno. Las pieles han sido la materia prima más utilizada para la obtención de gelatina de pescado. Sin embargo, las espinas y escamas son también una fuente potencial de gelatina y los trabajos publicados en la literatura científica sobre gelatina extraída a partir de estas materias primas han ido incrementándose en los últimos años. Se han descrito colágeno y gelatina extraídos de espinas y escamas de pargo japonés y tilapia del Nilo (Ikoma *et al.*, 2003), corvina negra y sargo chopo (Ogawa *et al.*, 2004), sardina (Nomura *et al.*, 1996), carpa herbívora (Li *et al.*, 2008), gallineta nórdica (Wang *et al.*, 2008), carpa plateada asiática (Wang & Regenstein, 2009), perca del Nilo (Muyonga *et al.*, 2004), o pez lagarto (Wangtueai & Noomhorm, 2009a). A diferencia de la piel, se requiere la desmineralización de espinas y escamas con ácidos o quelantes, como pretratamiento crítico en la extracción de gelatina y éste va a condicionar el rendimiento final, pureza, y fuerza de gel de la gelatina (Wang & Regenstein, 2009; Zhang *et al.*, 2011). En los últimos años, el colágeno y la gelatina de pescado han sido estudiados como fuente de péptidos biológicamente activos, con beneficios prometedores para la salud y aplicaciones tanto en la industria alimentaria como la farmacéutica.

La Esperasa es un tipo de serin-proteasa con actividad endopeptidasa obtenida a partir de *Bacillus* sp. con amplia especificidad de sustrato (Georgieva *et al.*, 2001). Aunque el uso de Esperasa para obtener hidrolizados bioactivos es escasa, algunos estudios han demostrado que los hidrolizados obtenidos con Esperasa a partir de diversos materiales tales como: colágeno, tubérculos de patata y las gliadinas de trigo poseen actividad antioxidante, inhibidoras de la ACE y anticancerígena (Pihlanto *et al.*, 2008; Thewissen *et al.*, 2011; Alemán *et al.*, 2011c).

La hipertensión es un problema a nivel mundial de proporciones epidémicas, que afecta al 15-20% de la población adulta. La enzima convertidora de la angiotensina-I (ACE) juega un rol importante en la regulación de la presión arterial y la hipertensión ya que cataliza la conversión de la angiotensina-I inactiva en angiotensina-II, un potente vasoconstrictor y a su vez inactiva la bradiquinina, que es un potente vasodilatador (Murray & FitzGerald, 2007). Los Inhibidores sintéticos de la ACE son a menudo utilizados en el tratamiento de la hipertensión y otras enfermedades cardíacas. Sin embargo, estos compuestos pueden ocasionar efectos secundarios (Atkinson & Robertson, 1979), por lo que el interés hacia los inhibidores naturales ha ido incrementándose. Hidrolizados y péptidos con una potente actividad inhibidora de la ACE han sido obtenidos a partir de materiales colagenosos de pescado. Sin embargo, la mayoría de estudios tratan acerca de la producción de hidrolizados inhibidores de la ACE a partir de gelatinas, por lo que existe escasa información acerca de hidrolizados a partir de otras fuentes ricas en colágeno, tales como las escamas. Fahmi *et al.* (2004) aislaron cuatro secuencias peptídicas con una alta actividad inhibidora de la ACE a partir de proteína hidrolizada de escamas de dorada, lo que indica que la gelatina de escamas puede ser una buena fuente de péptidos inhibidores de la ACE.

### 6.1.3. Objetivo

El objetivo de este estudio fue la obtención de productos de valor agregado a partir de escamas y espinas de dorada (*Sparus aurata*), obtenido como residuo de la industria procesadora de pescado de acuicultura. Las gelatinas de espinas y escamas se obtuvieron como co-productos, y se evaluaron sus características reológicas y químicas. Las gelatinas obtenidas con un rendimiento rentable se sometieron a hidrólisis enzimática y se evaluó la actividad inhibidora de ACE de una fracción peptídica inferior a 3kDa.

#### 6.1.4. Metodología experimental

Espinas y escamas de dorada (*Sparus aurata*), obtenidas a partir de residuos industriales, fueron utilizadas como materia prima para la extracción de gelatina. Estos materiales son ricos en colágeno, sin embargo para la obtención de gelatina es necesario eliminar cualquier tipo de materia adicional presente en los mismos, tales como lípidos, minerales o proteínas no colagenosas.

Para la extracción de gelatina a partir espinas de dorada se probaron dos métodos para eliminar las proteínas no colagenosas. En el primer caso se sumergieron las espinas en una solución de HCl 0.6M durante 18 horas. En el segundo caso se utilizó el coctel enzimático comercial Alcalasa al 0.1% (p/p) (Apartado 5.2.1).

Los compuestos lipídicos de todas las materias primas estudiadas fueron eliminados con alcohol isobutílico al 10%.

Tanto para espinas como escamas de dorada, la desmineralización se realizó en una solución de EDTA 0,5N durante toda la noche. A continuación se lavaron con agua y se trataron con ácido acético 0,05M.

La extracción de gelatina se llevó a cabo con agua destilada a 60° C durante 18 horas. Los extractos fueron filtrados a través de una gasa y secados a 45° C durante 18 horas en una estufa con circulación de aire forzado.

En las gelatinas obtenidas se evaluaron los siguientes parámetros: composición proximal, contenido en minerales, aminoácidos, propiedades viscoelásticas y fuerza de gel (Apartados 5.6 y 5.2.2).

La gelatina de escamas fue sometida a hidrólisis enzimática utilizando el cóctel enzimático comercial Esperasa durante 3 horas a 60 °C (Apartado 5.3.2).

El hidrolizado obtenido fue sometido a ultrafiltración utilizando una membrana de corte de 3 kDa (Apartado 5.4). En el mismo se evaluó la actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina-I (ACE) (Apartado 5.5.2).

## 6.1.5. Resultados y discusión

### 6.1.5.1. Gelatinas

#### 6.1.5.1.1. Extracción de gelatina

El rendimiento de la extracción de gelatina de escamas (9.55% p/p) fue mayor que los de gelatinas de espinas (Espinass-HCl: 2.90%; Espinas-Alc: 3.55% p/p). De las espinas pre-tratadas con HCl se obtuvo un rendimiento ligeramente inferior que de las espinas pre-tratadas mediante hidrólisis enzimática con Alcalasa, probablemente debido a la solubilidad del colágeno a pH ácido. Wang & Regenstein (2009) encontraron mayores pérdidas de proteína con HCl que con EDTA cuando ambos compuestos fueron utilizados para decalcificar escamas de pescado. Grandes diferencias en los rendimientos entre diferentes especies pueden ser encontradas debido a las condiciones de extracción (Giménez *et al.*, 2005c) o diferencias en el contenido de colágeno y el grado de entrecruzamiento (Jeya Shakila *et al.*, 2012). Sin embargo, el rendimiento de la gelatina de escamas de dorada fue similar al descrito para gelatina de escamas de pez lagarto (9.1-10.9 g/100g; Wangtueai *et al.*, 2010). Los rendimientos de ambas gelatinas de espinas fueron inferiores a los descritos para otras extracciones de gelatina de espinas de otras especies tales como pez gato americano, perca del Nilo, pargo rojo o mero (Muyonga *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009; Jeya Shakila *et al.*, 2012). En general, los rendimientos de las gelatinas extraídas de espinas o escamas son inferiores a los obtenidos a partir de piel de pescado, los cuales se han descrito en el rango entre 4-16 g/100g (Jeya Shakila *et al.*, 2012). Esto es debido a que las escamas y las espinas por lo general contienen más cenizas y menos colágeno que las pieles (Wang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009).

#### 6.1.5.1.2. Caracterización de la gelatina

La humedad, el contenido de proteína, grasa y cenizas de las gelatinas de espinas y escamas se detalla en la Tabla 6. Todas las gelatinas obtenidas mostraron similar contenido de humedad, inferior al 10%. La gelatina de

escamas mostró un alto contenido de proteína ( $91.6 \pm 1.4$  g/100 g) y un bajo contenido de cenizas ( $0.57 \pm 0.10$  g/100 g). El contenido de cenizas de las escamas de dorada fue de  $59.8 \pm 0.3$  g/100 g antes de la desmineralización; por lo tanto, la desmineralización de las escamas de pescado usando EDTA resultó un método efectivo, ya que solubiliza los cristales de hidroxipatita mediante la quelación de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en solución (Pati *et al.*, 2010). En cambio, el contenido de cenizas resultante en la gelatina de escamas de dorada fue inferior al descrito para gelatina obtenida a partir de escamas de otras especies, tales como pez lagarto (2.33 %; Wangtueai & Noomhorm, 2009a). Con respecto a las gelatinas obtenidas a partir de espinas de dorada, aunque el contenido de proteína fue inferior que el obtenido en la gelatina de escamas, los valores obtenidos están en el rango de los descritos para gelatinas de espinas de otras especies, tales como la perca del Nilo (78-86%; Muyonga *et al.*, 2004), pargo rojo (78%; Jeya Shakila *et al.*, 2012), mero (82%; Jeya Shakila *et al.*, 2012) o pez gato americano (78%; Liu *et al.*, 2009). El contenido de cenizas de la gelatina de espinas pre-tratadas con Alcalasa fue 1.6 veces mayor que el de la gelatina de espinas pre-tratadas con HCl ( $p < 0.05$ ). En este estudio, el HCl se utilizó para separar los restos de tejido muscular adheridos a las espinas, sin embargo, este compuesto se utiliza usualmente como agente desmineralizante en la extracción de gelatina a partir de espinas de pescado (Muyonga *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009).

**Tabla 6.** Humedad, proteína, cenizas y contenido de grasa (g/100 g) en gelatinas de espinas y escamas de dorada.

	Humedad	Proteína	Cenizas	Grasas
<b>Scales</b>	$9.69 \pm 0.01^b$	$91.6 \pm 1.4^b$	$0.57 \pm 0.10^a$	ND
<b>Bone-HCl</b>	$6.89 \pm 0.78^a$	$77.5 \pm 2.2^a$	$2.59 \pm 0.34^b$	$10.11 \pm 1.42^a$
<b>Bone-Alc</b>	$7.81 \pm 1.06^a$	$80.0 \pm 1.8^a$	$4.08 \pm 0.35^c$	$7.93 \pm 0.84^a$

Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

ND: no determinado



La composición de minerales de las tres gelatinas obtenidas se detalla en la Tabla 7. La composición de minerales estuvo directamente relacionada con el origen de la materia prima.  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  fueron los minerales más abundantes en las tres gelatinas. La gelatina de escamas mostró el menor contenido de todos los minerales analizados ( $p < 0.05$ ), a excepción de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual fue menor en la gelatina de espinas pre tratadas con HCl. Comparando el contenido en minerales de las escamas y de la gelatina resultante, la desmineralización con EDTA se consideró muy efectiva. No obstante, el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en la gelatina de escamas fue superior al descrito para gelatinas de piel de pescado (Giménez *et al.*, 2005a). El uso de HCl en el pre- tratamiento de espinas dio lugar a un incremento en la desmineralización, y por lo tanto, la gelatina resultante mostró un contenido de minerales más bajo que el de la gelatina obtenida a partir de espinas pre-tratadas con Alcalasa, especialmente en el caso del  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ .

**Tabla 7.** Análisis de minerales (mg/100 g gelatina) en gelatinas extraídas a partir de espinas y escamas de dorada.

	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Zn}^{2+}$
<b>Escamas</b>	$106 \pm 3^a$	$3.20 \pm 0.01^a$	$17.3 \pm 0.5^a$	$1.46 \pm 0.19^a$	$1.24 \pm 0.06^b$
<b>Espinas-HCl</b>	$724 \pm 11^b$	$61.2 \pm 0.7^c$	$338 \pm 6^b$	$16.9 \pm 0.6^b$	$1.29 \pm 0.09^b$
<b>Espinas-Alc</b>	$1560 \pm 9^c$	$13.8 \pm 0.4^b$	$1530 \pm 12^c$	$16.1 \pm 0.3^b$	$0.690 \pm 0.112^a$

Distintas letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

#### 6.1.5.1.3. Composición de aminoácidos

La composición de aminoácidos de las tres gelatinas estudiadas se detalla en la Tabla 8. Las gelatinas de escamas y espinas presentaron un perfil de aminoácidos similar entre sí. Ogawa *et al.* (2003) y Ogawa *et al.* (2004) encontraron el mismo patrón de distribución de aminoácidos en muestras de colágeno extraído a partir de pieles, espinas y escamas de corvina negra y sargo picudo, lo que sugiere que la composición química del colágeno tipo I se

mantuvo intacta en los diferentes tejidos. La composición de aminoácidos de las gelatinas de espinas y escamas fue similar al del colágeno intersticial, con un alto contenido de Gly e iminoácidos (Pro + Hyp); (33-34% y 17-18% respectivamente). Además, se pudieron observar relativamente altos contenidos de Ala, Glu, Asp, Ser y Arg, mientras que los contenidos de Tyr, His e Hyl fueron bajos. Se pudieron encontrar residuos de Cys en las tres gelatinas, a pesar de que la Cys no forma parte de la estructura del colágeno tipo I (Morales *et al.*, 2000). La presencia de Cys en la composición de aminoácidos indica que la gelatina podría contener pequeñas cantidades de otras proteínas presentes en las espinas y escamas, tales como elastina o queratina, las cuales son altamente insolubles y usualmente estables en sal. La presencia de cisteína ha sido descrita en gelatina de huesos de cabeza de pez gato americano (Liu *et al.*, 2009) o escamas de pez lagarto y carpa herbívora (Wangtueai & Noomhorm, 2009b; Zhang *et al.*, 2011), sin embargo, la mayoría de estudios no describen la presencia de este aminoácido en gelatinas de espinas o escamas. La estabilidad de la estructura triple-helicoidal en gelatinas renaturalizadas se ha descrito como proporcional al contenido de iminoácidos (Ledward, 1986). En especial, la Hyp se cree que juega un papel clave en la estabilización de la triple hélice de colágeno debido a su capacidad para formar puentes de hidrógeno (Ledward, 1986; Mizuno *et al.*, 2003). Junto con la Pro e Hyp, la Ala se encuentra en regiones no polares, donde predominan las secuencias de tipo Gly-Pro-Y o Gly-X-Hyp (Ledward, 1986). En términos generales, una gelatina con alto contenido de Pro, Hyp y Ala, muestra mejores propiedades viscoelásticas que otras con un bajo contenido de estos aminoácidos (Gómez-Guillén *et al.*, 2002). De acuerdo con estos resultados, pequeñas diferencias en las propiedades viscoelásticas de estos preparados de gelatina podrían esperarse basados únicamente en la composición de aminoácidos.

**Tabla 8.** Composición de aminoácidos de las gelatinas de escamas y espinas de dorada.

Aminoácido	Número de residuos/1000 residuos		
	Escamas	Espinas-Alc	Espinas-HCl
Hyp	72	72	73
Asx	45	46	46
Thr	24	25	25
Ser	46	47	47
Glx	70	70	71
Pro	113	112	108
Gly	345	339	341
Ala	123	123	121
Cys	1	2	2
Val	17	18	19
Met	15	14	16
Ile	5	7	8
Leu	18	20	21
Tyr	4	4	3
Phe	14	14	14
His	5	6	5
Lys	27	25	24
Arg	50	50	49
Hyl	6	7	6
<b>Iminoácidos (Pro + Hyp)</b>	<b>185</b>	<b>183</b>	<b>181</b>
<b>Pro hidroxilación (%)</b>	<b>39</b>	<b>39</b>	<b>41</b>
<b>Lys hidroxilación (%)</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	<b>21</b>

Asx = Asp + Asn; Glx = Glu + Gln

#### 6.1.5.1.4. Fuerza del gel

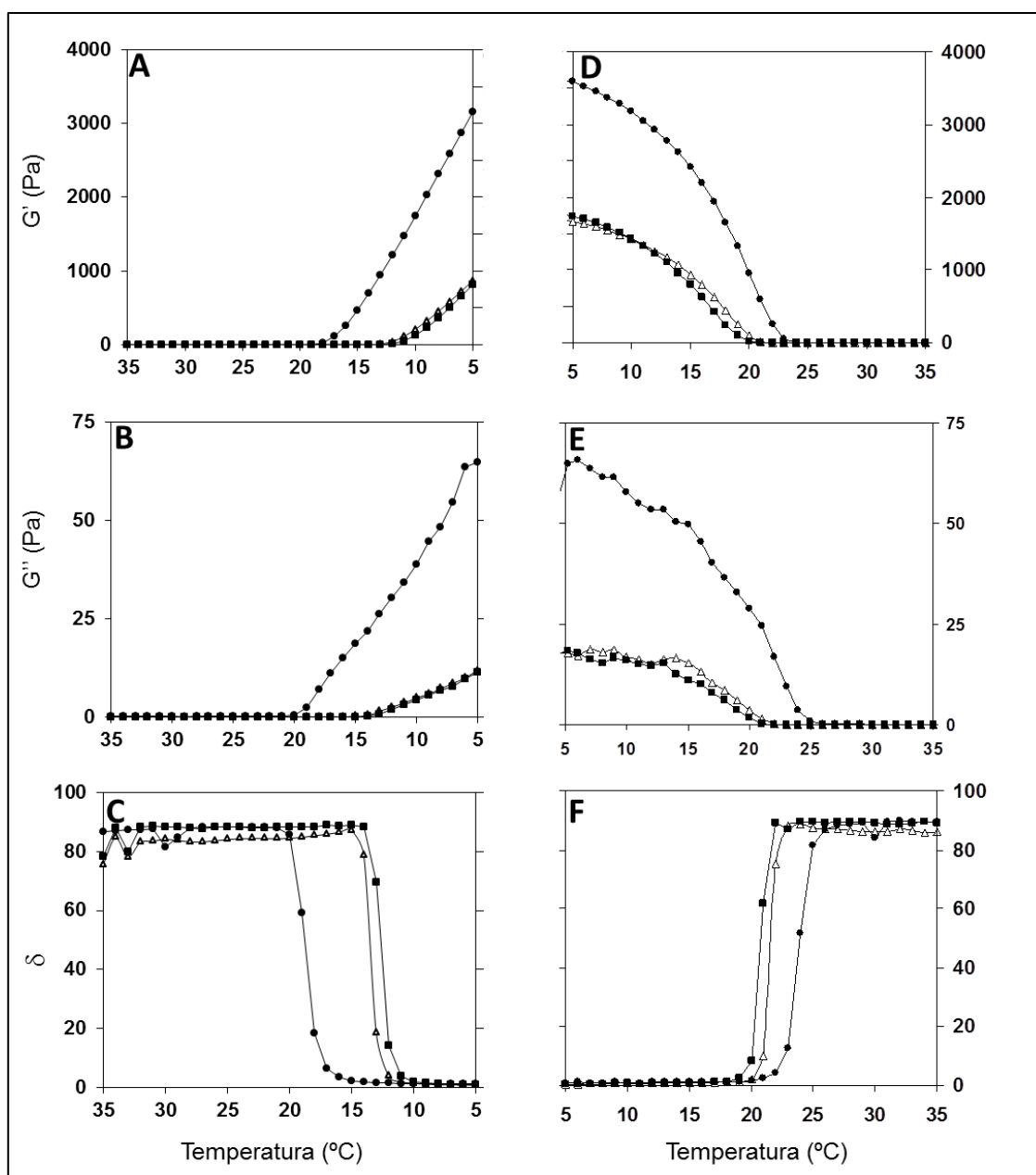
La fuerza de gel fue notablemente diferente entre los geles de las tres gelatinas estudiadas. La gelatina de escamas mostró la mayor fuerza de gel ( $126 \pm 1$  g;  $p < 0.05$ ), y no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre ambas gelatinas de espinas ( $87.3 \pm 0.3$  y  $81.7 \pm 0.1$  g para gelatinas de espinas pre-tratadas con HCl y Alcalasa, respectivamente). La gran diferencia en la fuerza de gel entre las gelatinas de espinas y de escamas no pudo ser atribuida a

diferencias en la composición de aminoácidos (Tabla 8). El contenido de Pro e Hyp es particularmente importante para el efecto gelificante, ya que estos aminoácidos estabilizan la estructura ordenada cuando la gelatina forma la red del gel, sin embargo, el contenido de estos dos aminoácidos fue similar en las gelatinas de espinas y escamas. El alto contenido de proteína de la gelatina de escamas en comparación con las gelatinas de espinas ( $p < 0.05$ ) podría explicar su mayor fuerza de gel, ya que la fuerza del gel es directamente proporcional a la concentración de proteína (Choi & Regenstein, 2000). La fuerza de gel de una gelatina comercial bovina ( $105 \pm 5$  g, valor obtenido para una gelatina de aproximadamente 200 grados Bloom) utilizada con fines comparativos, fue mayor que la obtenida en las gelatinas de espinas, pero inferior a la de gelatina de escamas ( $p < 0.05$ ), lo que indica la buena calidad de la gelatina de escamas obtenida en este estudio.

#### 6.1.5.1.5. *Propiedades viscoelásticas*

Las propiedades viscoelásticas de las tres gelatinas obtenidas fueron analizadas tras disolverlas en agua destilada (6.67 g/100mL). La gelatina de escamas presentó la mayor capacidad gelificante, mostrando un significativamente mayor incremento en  $G'$  y  $G''$  tras el enfriamiento que las gelatinas de espinas, las cuales presentaron un comportamiento similar entre sí (Figura 13A y 13B). El análisis de la variación del ángulo de fase mostró que el inicio de la gelificación fue a una temperatura inferior en ambas gelatinas obtenidas a partir de espinas (alrededor de 14-15 °C) en comparación a la gelatina de escamas, en la que la gelificación empezó a 20 °C (Figura 13C). Estas diferencias también fueron observadas cuando se analizaron las propiedades viscoelásticas en la rampa de calentamiento de 5 a 35 °C. Mientras que ambas gelatinas de espinas se comportaban de un modo similar, la gelatina de escamas mostró valores notablemente mayores de  $G'$  y  $G''$  (Figura 13D y E). La estabilidad térmica del gel de gelatina de escamas también fue mayor, mostrando una temperatura de fusión entre 3 y 4°C mayor que las gelatinas de espinas (26 °C frente a 22-23 °C para gelatina de escamas y de espinas respectivamente; Figura 13F).

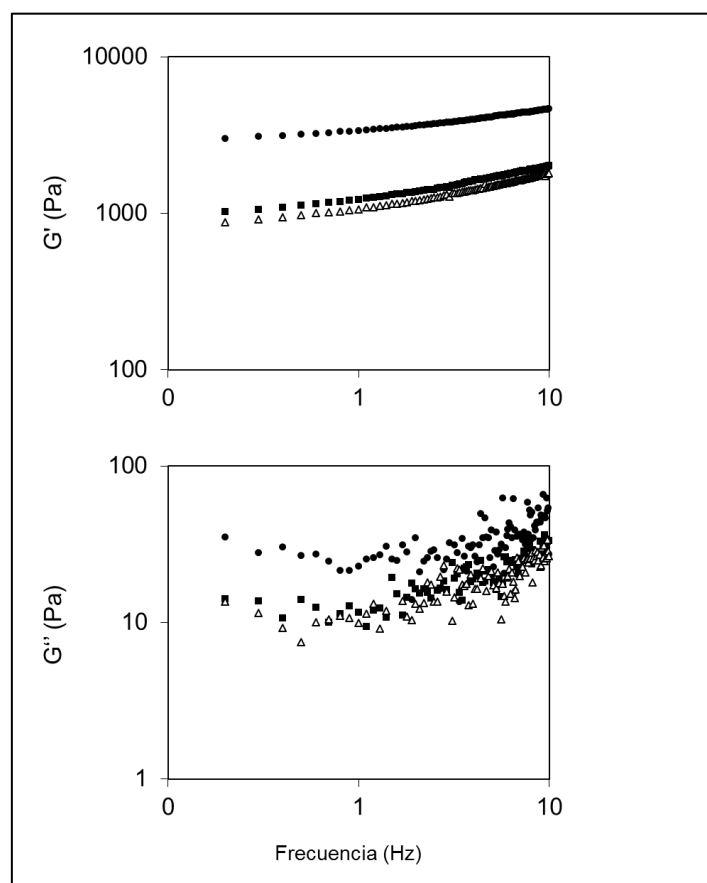
Ambas gelatinas de espinas mostraron temperaturas de gelificación y de fusión inferiores a las descritas para gelatinas de espinas obtenidas de otras especies de pescado. De este modo, valores en el rango de 16-19 °C y 25-26.5 °C han sido descritos, respectivamente, como puntos de gelificación y fusión para gelatinas obtenidas a partir de espinas de pago rojo, mero, perca del Nilo, o pez gato americano (Muyonga *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2009; Jeya Shakila *et al.*, 2012). Con respecto a la gelatina de escamas obtenida en este estudio, (Zhang *et al.*, 2011) publicaron valores similares para las temperaturas de gelificación y fusión de gelatina de escamas de carpa herbívora (20.8 °C y 26.9 °C, respectivamente).



**Figura 13.** Propiedades viscoelásticas de las gelatinas. Cambios en el módulo de elasticidad ( $G'$ ; A, D), módulo de viscosidad ( $G''$ ; B, E) y ángulo de fase ( $\delta$ ; C, F), fueron determinados durante el enfriamiento desde 35 °C a 5 °C (A-C) y el subsiguiente calentamiento desde 5 a 35 °C (D-F). (●) Escamas: gelatina de escamas; (Δ) E-HCl: gelatina obtenida de espinas pretratadas con HCl; (■) E-Alc: gelatina obtenida de espinas pretratadas con Alcalasa.

La Figura 14 muestra el espectro mecánico de las soluciones de gelatina a 5 °C, en términos de  $G'$  y  $G''$  en función de la frecuencia angular. Antes de empezar el análisis, las soluciones de gelatina fueron sometidas a una breve

maduración en frío a 5 °C durante 15 minutos, tiempo durante el cual las gelatinas mostraron un comportamiento de gel, como se identifica dado que los valores de  $G' > G''$  en todos los casos.



**Figura 14.** Módulo elástico ( $G'$ , Pa) y módulo viscoso ( $G''$ , Pa) en función de la frecuencia angular de las soluciones de gelatina a 5 °C. (●) Escamas: gelatina de escamas; (Δ) E-HCl: gelatina obtenida de espinas pre-tratadas con HCl; (■) E-Alc: gelatina obtenida de espinas pre-tratadas con Alcalasa.

La dependencia de la frecuencia de  $G'$  y  $G''$  varió considerablemente dependiendo de la materia prima. El módulo elástico  $G'$  fue claramente inferior en las gelatinas de espinas en comparación a las gelatinas de escamas. El pre-tratamiento de las espinas, tanto con Alcalasa como con HCl no modificó substancialmente el comportamiento mecánico de las respectivas gelatinas. Al contrario que  $G''$ , los valores de  $G'$  se ajustaron satisfactoriamente a la ley de la potencia ( $R^2 > 0.98$ ) en todos los casos, tal y como se espera para geles de gelatina madurados en frío. El exponente de la ley de la potencia  $n'$  fue

notablemente inferior en la gelatina de escamas ( $n' = 0.1269$ ) que el encontrado en las gelatinas de espinas ( $n' = 0.1980$  en Espinas-Alcalasa;  $n' = 0.2086$  en Espinas-HCl), datos que sugieren que la gelatina de escamas consiste en una red proteica más interconectada con una mejor estabilidad estructural (Michon *et al.*, 1993). A partir de estos datos, se podría también concluir que el pre-tratamiento de las espinas con Alcalasa da lugar a geles ligeramente más estables que el pre-tratamiento con HCl.

#### 6.1.5.2. Hidrolizados de gelatina de escamas

##### 6.1.5.2.1. Hidrólisis y fraccionamiento del hidrolizado

La hidrólisis de la gelatina de escamas con Esperasa alcanzó un grado de hidrólisis (DH) de  $16.1 \pm 0.3\%$  tras 3 horas a  $60^\circ\text{C}$ . La gelatina de espinas no fue estudiada dado que los rendimientos fueron muy bajos, lo que sugiere que la obtención de hidrolizados a partir de este material podría no ser comercialmente factible. La velocidad de la hidrólisis fue alta en la etapa inicial (15-20 minutos) y luego fue decreciendo gradualmente hasta llegar a una fase estacionaria a partir de las 2.5 horas de hidrólisis. Este perfil cinético es similar al perfil clásico de las hidrólisis proteicas inducidas por proteasas (Gbogouri *et al.*, 2004). Se obtuvieron valores similares de DH en estudios previos con otros materiales colagenosos, tales como gelatina de calamar ( $15.5 \pm 0.8\%$ ) utilizando Esperasa bajo similares condiciones experimentales (datos no mostrados). Algunas propiedades bioactivas se han asociado con el rango específico de pesos moleculares del hidrolizados (Park *et al.*, 2001). Con respecto a la actividad inhibidora de la ACE, los péptidos bioactivos generalmente se concentran por ultrafiltración a través de filtros de membrana de 3 y 10 kDa, ya que los péptidos inhibidores de la ACE usualmente están compuestos de entre 2 y 30 aminoácidos (Erdmann *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2011). En este estudio el hidrolizado de gelatina de escamas fue ultrafiltrado a través de membranas con un valor de corte de 3 kDa, con el fin de enriquecer el hidrolizado en péptidos de bajo peso molecular.



#### 6.1.5.2.2. Actividad antihipertensiva del hidrolizado de gelatina de escamas

La cantidad de hidrolizado filtrado a través de la membrana de 3 kDa (F3) requerido para inhibir el 50% de la actividad de la ACE ( $IC_{50}$ ) fue  $59.9 \pm 3.9$   $\mu\text{g/mL}$ . A pesar de que las escamas de pescado son un subproducto muy poco estudiado, Fahmi *et al.* (2004) describieron que péptidos inhibidores de la ACE con altas actividades pueden ser obtenidos a partir de hidrolizados de escamas de dorada, con valores de  $IC_{50}$  entre 25 y 120  $\mu\text{g/mL}$ . Se ha descrito actividad inhibidora de la ACE en hidrolizados y fracciones peptídicas obtenidos a partir de diferentes subproductos marinos. En general los valores de  $IC_{50}$  descritos para esos subproductos son mayores a los obtenidos en este estudio, aunque el uso de diferentes métodos para probar la capacidad inhibidora de la ACE, hace difícil la comparación directa entre los valores de  $IC_{50}$  obtenidos. Sin embargo, este valor de  $IC_{50}$  es mucho más alto que el valor de  $IC_{50}$  obtenido para el inhibidor sintético de la ACE Enalapril (2.7  $\mu\text{g/mL}$ ; Alemán *et al.*, 2011c), sin embargo esta droga sintetizada químicamente a menudo ocasiona efectos secundarios en los pacientes (Tabacova & Kimmel, 2001). He *et al.* (2006) publicaron valores  $IC_{50}$  de 220  $\mu\text{g/mL}$  para una fracción menor de 3 kDa de gamba, mientras que el  $IC_{50}$  de una fracción peptídica (1-3 kDa) obtenida a partir de músculo de merluza fue de 164  $\mu\text{g/mL}$  (Samaranayaka *et al.*, 2010). Cinq-Mars & Li-Chan (2007) describieron que la fracción de peso molecular inferior a 3 kDa obtenida a partir de hidrolizado de merluza mediante ultrafiltración, presentaba valores  $IC_{50}$  de alrededor de 40  $\mu\text{g/mL}$ , aunque la ultrafiltración a través de una membrana de corte de 10 kDa solo alcanzó una reducción del 10% en los valores de  $IC_{50}$ .

#### **6.1.6. Conclusión**

Se pueden obtener gelatinas con propiedades gelificantes aceptables a partir de residuos de dorada (espinas y escamas). Las gelatinas de espinas presentaron peores propiedades reológicas e inferiores rendimientos, lo que denota que se necesita un pre-tratamiento/tratamiento más exhaustivo. Por el contrario, de las escamas de dorada se alcanzó un elevado rendimiento, obteniéndose una gelatina con elevada fuerza de gel y apreciables propiedades viscoelásticas. Además, la gelatina obtenida a partir de escamas representa una fuente prometedora para el aislamiento de péptidos con alta actividad inhibidora de la ACE.

### **6.1.7. Bibliografía**

Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(4), 1044-1051.

Atkinson, A. B., & Robertson, J. I. S. (1979). Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. *Lancet*, 2(8147), 836-839.

Choi, S. -, & Regenstein, J. M. (2000). Physicochemical and Sensory Characteristics of Fish Gelatin. *Journal of Food Science*, 65(2), 194-199.

Cinq-Mars, C. D., & Li-Chan, E. C. Y. (2007). Optimizing angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate using response surface methodology and ultrafiltration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9380-9388.

Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 643-654.

Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H. C., Shigematsu, T., Kida, K., & Uemura, Y. (2004). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39(10), 1195-1200.

Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69(8), C615-C622.

Georgieva, D. N., Stoeva, S., Voelter, W., Genov, N., & Betzel, C. (2001). Differences in the Specificities of the Highly Alkalophilic Proteinases Savinase and Esperase Imposed by Changes in the Rigidity and Geometry of the Substrate Binding Sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 387(2), 197-201.

Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2005a). The role of salt washing of fish skins in chemical and rheological properties of gelatin extracted. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 951-957.

Giménez, B., Turnay, J., Lizarbe, M. A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2005b). Use of lactic acid for extraction of fish skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 941-950.

Gómez-Guillén, M. C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., & Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 25-34.

- He, H. -, Chen, X. -, Sun, C. -, Zhang, Y. -, & Zhou, B. -. (2006). Analysis of novel angiotensin-i-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *Journal of Peptide Science*, 12(11), 726-733.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., & Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International journal of biological macromolecules*, 32(3-5), 199-204.
- Jeya Shakila, R., Jeevithan, E., Varatharajakumar, A., Jeyasekaran, G., & Sukumar, D. (2012). Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 30-36.
- Ledward, D. A. (1986). Gelation of gelatin. *Functional Properties of Food Macromolecules*, 171-201.
- Li, C., Zhong, Z., Wan, Q., Zhao, H., Gu, H., & Xiong, S. (2008). Preparation and thermal stability of collagen from scales of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *European Food Research and Technology*, 227(5), 1467-1473.
- Liu, W., Li, G., Miao, Y., & Wu, X. (2009). Preparation and characterization of pepsin-solubilized type i collagen from the scales of snakehead (*Ophiocephalus argus*). *Journal of Food Biochemistry*, 33(1), 20-37.
- Michon, C., Cuvelier, G., & Launay, B. (1993). Concentration dependence of the critical viscoelastic properties of gelatin at the gel point. *Rheological Acta*, 32(1), 94-103.
- Mizuno, K., Hayashi, T., & Bächinger, H. P. (2003). Hydroxylation-induced Stabilization of the Collagen Triple Helix FURTHER CHARACTERIZATION OF PEPTIDES WITH 4 (R)-HYDROXYPROLINE IN THE Xaa POSITION. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32373-32379.
- Morales, J., Montero, P., & Moral, A. (2000). Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2142-2148.
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current pharmaceutical design*, 13(8), 773-791.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 581-592.

Nomura, Y., Sakai, H., Ishii, Y., & Shirai, K. (1996). Preparation and some properties of type I collagen from fish scales. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(12), 2092-2094.

Ogawa, M., Moody, M. W., Portier, R. J., Bell, J., Schexnayder, M. A., & Losso, J. N. (2003). Biochemical Properties of Black Drum and Sheepshead Seabream Skin Collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8088-8092.

Ogawa, M., Portier, R. J., Moody, M. W., Bell, J., Schexnayder, M. A., & Losso, J. N. (2004). Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry*, 88(4), 495-501.

Park, P. -, Jung, W. -, Nam, K. -, Shahidi, F., & Kim, S. -. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6), 651-656.

Pati, F., Adhikari, B., & Dhara, S. (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource technology*, 101(10), 3737-3742.

Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. J. (2008). ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chemistry*, 109(1), 104-112.

Samaranayaka, A. G. P., Kitts, D. D., & Li-Chan, E. C. Y. (2010). Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1535-1542.

Tabacova, S. A., & Kimmel, C. A. (2001). Enalapril: pharmacokinetic/dynamic inferences for comparative developmental toxicity : A review. *Reproductive Toxicology*, 15(5), 467-478.

Thewissen, B. G., Pauly, A., Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2011). Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by wheat gliadin hydrolysates. *Food Chemistry*, 127(4), 1653-1658.

Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., & Hu, Q. (2008). Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry*, 108(2), 616-623.

Wang, Y., & Regenstein, J. M. (2009). Effect of EDTA, HCl, and Citric Acid on Ca Salt Removal from Asian (Silver) Carp Scales Prior to Gelatin Extraction. *Journal of Food Science*, 74(6), C426-C431.

Wangtueai, S., & Noomhorm, A. (2009a). Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida* spp.) scales. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 825-834.

Wangtueai, S., & Noomhorm, A. (2009b). Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida* spp.) scales. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 825-834.

Wangtueai, S., Noomhorm, A., & Regenstein, J. M. (2010). Effect of Microbial Transglutaminase on Gel Properties and Film Characteristics of Gelatin from Lizardfish (*Saurida* spp.) Scales. *Journal of Food Science*, 75(9), C731-C739.

Wilson, J., Hayes, M., & Carney, B. (2011). Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products. *Food Chemistry*, 129(2), 235-244.

Zhang, F., Xu, S., & Wang, Z. (2011). Pre-treatment optimization and properties of gelatin from freshwater fish scales. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), 185-193.



**FRACCIONES PEPTÍDICAS OBTENIDAS A PARTIR DE TÚNICA  
DE CALAMAR GIGANTE CON ACTIVIDADES ANTIOXIDANTE,  
ANTIHIPERTENSIVA Y ANTIMICROBIANA**





### **6.2.1. Resumen**

Se utilizaron túnicas de calamar gigante sometidas a deshidratación por dos métodos diferentes: liofilización y secado por aire forzado. Las túnicas deshidratadas fueron directamente hidrolizadas con pepsina, Alcalasa y Esperasa. Las túnicas liofilizadas mostraron una mejor aptitud para la hidrólisis que las secadas con aire forzado. La pepsina mostró la menor eficiencia proteolítica, obteniéndose hidrolizados con baja actividad antioxidante, mientras que las fracciones peptídicas obtenidas por la hidrólisis con Alcalasa y Esperasa mostraron una mayor capacidad para secuestrar radicales libres, mayor actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE), junto a una notable actividad antimicrobiana, siendo *B. Cereus*, *B. Coagulans* y *D. Hansenii* las bacterias que presentaron una mayor sensibilidad. Las túnicas deshidratadas mostraron

ser una alternativa para la obtención directa de péptidos bioactivos frente a los obtenidos mediante una extracción previa de gelatina.

### 6.2.2. Introducción

El calamar gigante (*Dosidicus gigas*) es una especie ampliamente distribuida en el Océano Pacífico y es especialmente abundante cerca de las costas de Perú y México. El gran tamaño y grosor del manto, hace necesario que se comercialice transformado, bien sea en forma de anillas o rabas o en un grado de transformación mayor. De cualquier forma, generalmente se comercializa limpio, pelado y troceado como mínimo, lo que implica la generación de grandes cantidades de residuos de colágeno (túnicas internas y externas), residuos a partir de los cuales se pueden obtener productos de alto valor añadido. El colágeno y la gelatina procedentes de túnica de calamar han sido descritos como fuente de péptidos biológicamente activos con actividad antioxidante, debido a su capacidad de secuestrar radicales libres y a sus efectos quelantes de iones metálicos, reduciendo las reacciones de peroxidación lipídica (Mendis *et al.*, 2005b; Giménez *et al.*, 2009a); así como a su alta capacidad inhibidora de la actividad antihipertensiva medida por la inhibición de la enzima ACE (Alemán *et al.*, 2011b). Con respecto a las propiedades antimicrobianas de los hidrolizados de colágeno y gelatina, la información publicada es muy escasa. Gómez-Guillén *et al.* (2010) describieron la actividad antimicrobiana de fracciones peptídicas (1-10 kDa y <1 kDa) procedentes de gelatinas de atún y calamar.

En todos estos estudios mencionados, se realizó una extracción previa de gelatina para facilitar la hidrólisis enzimática posterior. Por otro lado, existe la necesidad de estudiar métodos para la conservación de estas túnicas, ya que generalmente permanecen junto al resto de subproductos generados en el procesado industrial, por lo que corren riesgo de un rápido deterioro debido a causas enzimáticas o microbiológicas. Según Giménez *et al.* (2005b), el secado parece ser un método adecuado para la conservación a largo plazo de pieles de pescado, proceso que ofrece importantes ventajas económicas en comparación al de la congelación.

Los hidrolizados y péptidos procedentes de colágeno y gelatina son obtenidos generalmente mediante proteólisis enzimática. En numerosos estudios acerca de la obtención de hidrolizados y péptidos procedentes de colágeno y gelatina, se ha utilizado el coctel enzimático comercial Alcalasa, debido a su amplia especificidad, así como los altos grados de hidrólisis que se pueden alcanzar en un tiempo relativamente corto bajo condiciones moderadas (Diniz & Martin, 1996; Benjakul & Morrissey, 1997). El uso de Esperasa para la obtención de hidrolizados bioactivos es escaso, aunque Alemán *et al.* (2011c) describieron el uso de esta enzima para producir hidrolizados procedentes de gelatina de túnica de calamar con actividades antioxidante, antihipertensiva y anticáncer. El peso molecular promedio de los hidrolizados proteicos es uno de los factores que más influyen en sus actividades biológicas (Jeon *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001). La ultrafiltración y/o nanofiltración puede ser un método de fraccionamiento útil y factible a nivel industrial, para la obtención de poblaciones peptídicas ricas en un determinado tamaño molecular y una alta bioactividad, dependiendo de la composición del hidrolizado de partida y de la actividad estudiada (Jeon *et al.*, 1999; Picot *et al.*, 2010). Este método ha sido aplicado con éxito en el fraccionamiento y la caracterización funcional de hidrolizados procedentes de gelatina de pieles de cobia y calamar (Lin & Li, 2006; Yang *et al.*, 2008); y como primer paso en el aislamiento y purificación de péptidos bioactivos (Kim *et al.*, 2001a; Mendis *et al.*, 2005b; Zhao *et al.*, 2007; Alemán *et al.*, 2011b).

### **6.2.3. Objetivo**

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad biológica de hidrolizados proteicos obtenidos con diferentes enzimas (pepsina, Alcalasa, Esperasa) a partir de túnicas de calamar, desecadas mediante liofilización o secado por aire forzado. Los hidrolizados fueron fraccionados mediante ultrafiltración y se evaluaron las actividades antioxidante, antimicrobiana e inhibidora de la ACE en cada una de las fracciones peptídicas.

#### **6.2.4. Metodología experimental**

Túnicas de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), obtenidas de residuos industriales, fueron utilizadas para la obtención de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas.

Con el fin de separar el tejido muscular de la túnica (material rico en colágeno), las túnicas fueron procesadas en una máquina separadora de espinas (Baader 694, Alemania). El producto de este proceso, fue colocado en 6 partes de agua con NaCl al 5% durante 24 horas, con el fin de facilitar la eliminación de la proteína miofibrilar adherida mediante solubilización. El lavado final se realizó mediante agitación mecánica, proceso en el cual se eliminaron los pequeños restos de músculo adherido a la túnica. Finalmente la túnica se aclaró con agua y se escurrió en un tamiz (Apartado 5.1.1).

Las túnicas limpias se separaron en 2 lotes, un lote se liofilizó, se envasó al vacío y se almacenó a -20° C (P-L); el segundo lote se secó en una estufa con circulación de aire forzado a 45° C durante 12 horas, se envasó al vacío y se almacenó a -20° C (P-D).

Las túnicas deshidratadas fueron sometidas a hidrólisis enzimática utilizando pepsina, Alcalasa y Esperasa, con el fin de identificar las diferencias entre los hidrolizados obtenidos con estas enzimas y el proceso de deshidratación de la túnica de calamar (Apartado 5.3.1).

Se analizó la distribución de tamaños moleculares de los hidrolizados obtenidos mediante electroforesis y por cromatografía de exclusión por tamaños (Apartado 5.4.1). Además se estudió la actividad antioxidante mediante la capacidad para secuestrar radicales ABTS de los hidrolizados (Apartado 5.5.1).

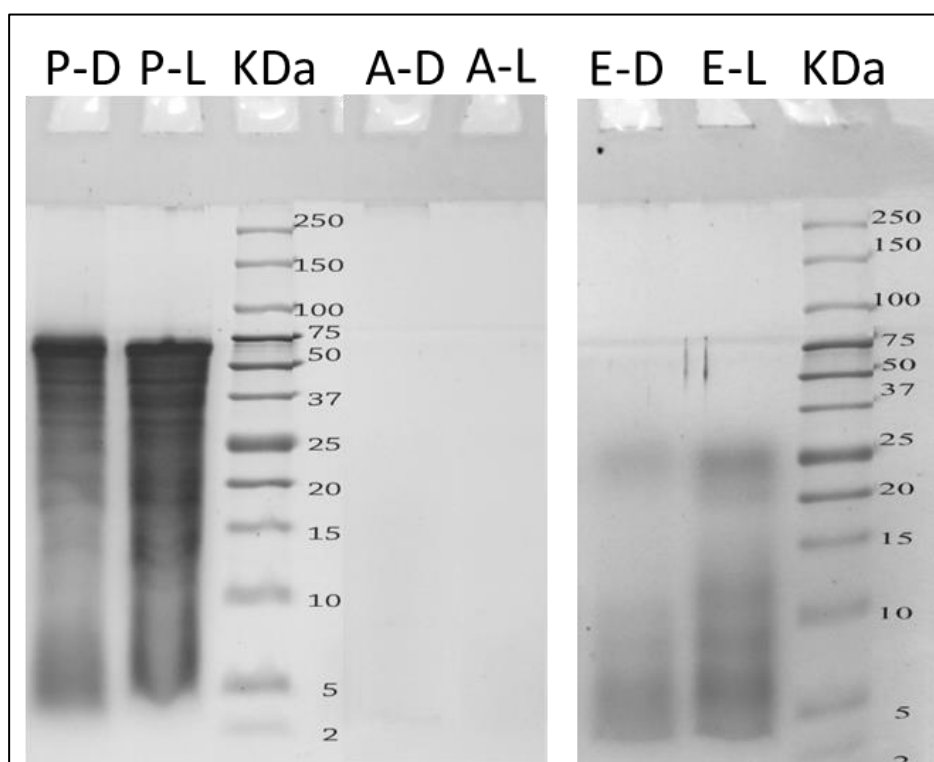
Las muestras producto de la hidrólisis con Alcalasa y Esperasa fueron separadas por ultrafiltración tangencial, utilizando membranas de corte de 10, 3 y 1 kDa (Apartado 5.4).

Para cada una de las fracciones obtenidas se analizó su composición de aminoácidos de aminoácidos (Apartado 5.6.1) y se analizaron sus actividades antimicrobiana, antioxidante, mediante su capacidad secuestradora de radicales ABTS y antihipertensiva, mediante su actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina-I (ACE) (Apartados 5.5.1–5.5.3).

## 6.2.5. Resultados y discusión

### 6.2.5.1. Distribución de pesos moleculares

Los hidrolizados proteicos obtenidos a partir de túnicas liofilizadas mostraron una mayor dispersión de pesos moleculares que los obtenidos a partir de túnicas secadas por aire forzado en el caso de los tratamientos con pepsina y Esperasa (Figura 15). Esto significa que las túnicas liofilizadas presentaron una mayor aptitud para la hidrólisis que las túnicas secadas por aire. Los hidrolizados con pepsina mostraron las bandas peptídicas de mayor peso molecular ( $\leq 75$  kDa), revelando la menor eficiencia de esta enzima en la degradación de proteínas.

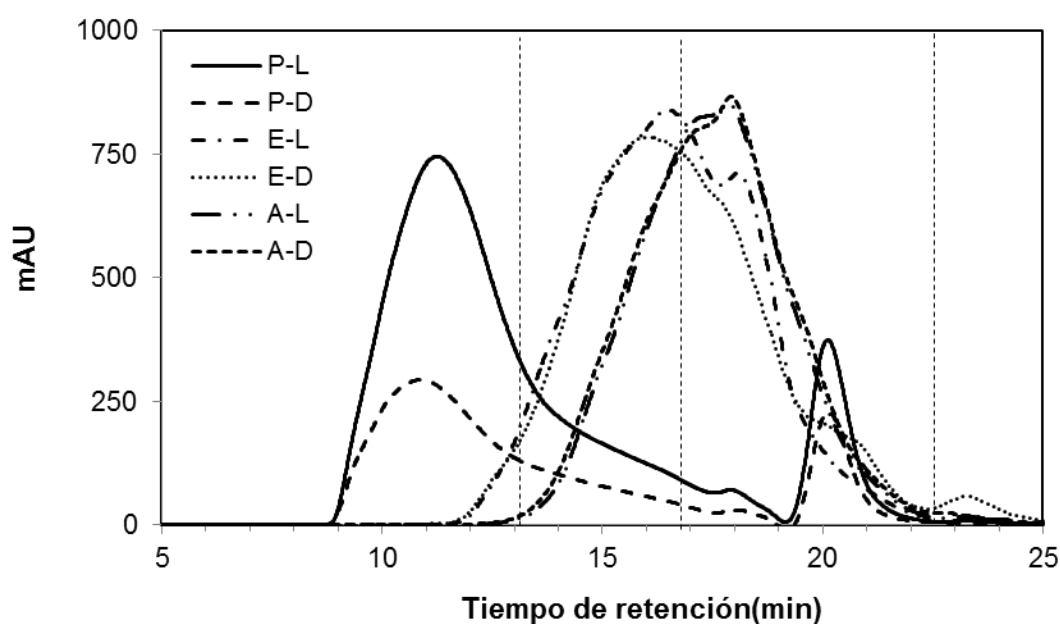


**Figura 15.** Perfiles electroforéticos de los hidrolizados de túnica de calamar (SDS-PAGE). kDa = Patrón de pesos moleculares; P = pepsina; A = Alcalasa; E = Esperasa; D = Túnica secada por aire forzado; L = Túnica liofilizada.

Se observó una distribución de pesos moleculares similares en los hidrolizados de Esperasa (E-D, E-L), además se apreció una banda proteica de alrededor



de 25 kDa mientras que la mayor área de tinción se correspondió con pesos moleculares inferiores a 10 kDa. Por el contrario, no se pudieron ver bandas peptídicas en los hidrolizados con Alcalasa (A-D, A-L), indicando un grado de proteólisis similar y considerablemente alto en ambos hidrolizados.



**Figura 16.** Cromatogramas de exclusión por tamaños de los hidrolizados de túnica de calamar. P = pepsina; A = Alcalasa; E = Esperasa; D = Túnica secada por aire forzado; L = Túnica liofilizada.

Por lo general, los hidrolizados compuestos en su mayoría por péptidos de bajo peso molecular, no pueden ser caracterizados correctamente mediante electroforesis (Khantaphant & Benjakul, 2008; Giménez *et al.*, 2009b). Por consiguiente, a fin de determinar las diferencias en la distribución de pesos moleculares de los péptidos más pequeños, se realizó un análisis de tamaños moleculares mediante cromatografía líquida de exclusión molecular (SEC-HPLC) en un rango de fraccionamiento entre 7000 y 100 Da (Figura 16). En concordancia con el perfil electroforético, los hidrolizados con pepsina, tanto procedentes de túnica secada por aire como liofilizada, mostraron el menor grado de degradación proteica, predominando los péptidos de tamaños moleculares > 6500 Da. Por otra parte, los hidrolizados con Alcalasa mostraron

el mayor grado de hidrólisis, con una proporción de péptidos por debajo de 1300 Da, mayor que en los hidrolizados con Esperasa (Figura 16).

#### 6.2.5.2. Actividad antioxidante de los hidrolizados

La capacidad para secuestrar radicales libres de los hidrolizados proteicos fue evaluada mediante ABTS (Tabla 9). Las túnicas liofilizadas y secadas por aire forzado dieron lugar a hidrolizados con similar actividad antioxidante en el caso de los hidrolizados con Alcalasa y Esperasa ( $\sim 43$  mg VCEAC / g muestra;  $p > 0.05$ ). Sin embargo, en el caso de la hidrólisis con pepsina, la actividad antioxidante procedente de las túnicas liofilizadas fue dos veces mayor que la de las túnicas secadas ( $p < 0.05$ ). La capacidad secuestrante de radicales ABTS de los hidrolizados con Alcalasa y Esperasa fue mucho mayor a la encontrada en los hidrolizados con pepsina ( $p < 0.05$ ). La hidrólisis de túnica de calamar con pepsina parece ser inadecuada para obtener hidrolizados con capacidad antioxidante, probablemente como consecuencia de la baja eficiencia de la pepsina para producir péptidos de bajo peso molecular.

**Tabla 9.** Actividad captadora de radicales ABTS. Diferentes letras (a, b, c) indican diferencias significativas entre las muestras

	<b>ABTS (mg VCEAC/g)</b>
<b>A-L</b>	$43.79 \pm 0.06^c$
<b>A-D</b>	$43.53 \pm 0.06^c$
<b>E-L</b>	$43.36 \pm 0.07^c$
<b>E-D</b>	$42.95 \pm 0.07^c$
<b>P-L</b>	$12.52 \pm 0.46^b$
<b>P-D</b>	$6.41 \pm 0.08^a$

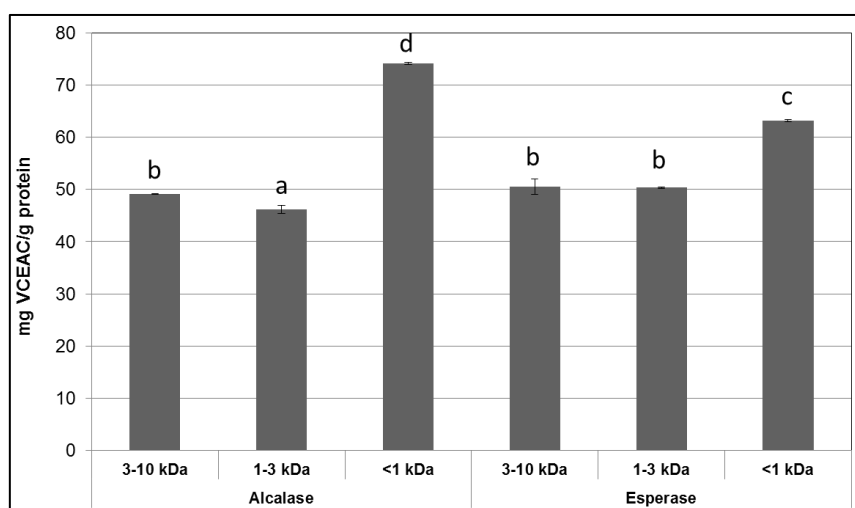
P = pepsina; A = Alcalasa; E = Esperasa; D = Túnica secada por aire forzado; L = Túnica liofilizada.

El peso molecular promedio es uno de los factores más importantes que determinan la actividad biológica de un hidrolizado, incluyendo la actividad antioxidante (Jeon *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001) y la mayoría de péptidos con

actividad antioxidante descritos en la literatura son oligopéptidos de bajo peso molecular (Jia *et al.*, 2010). Además, la especificidad de proteasa afecta no sólo el tamaño, sino también la cantidad y la secuencia de aminoácidos de los péptidos, que a su vez también influye en la actividad antioxidante de los hidrolizados (Chen *et al.*, 1995; Jeon *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003).

#### 6.2.5.3. Actividad antioxidante de las fracciones peptídicas.

Dada la mayor aptitud de las tónicas liofilizadas para la hidrólisis, estos hidrolizados fueron seleccionados para el análisis de la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas de distinto peso molecular. En vista de la baja actividad antioxidante encontrada en los hidrolizados con pepsina, la actividad antioxidante de estas fracciones peptídicas no fue determinada. Los hidrolizados con Alcalasa y Esperasa fueron fraccionados mediante ultrafiltración y se obtuvieron 3 fracciones peptídicas (3-10 kDa, 1-3 kDa, <1 kDa). Todas las fracciones obtenidas presentaron capacidad captadora de radicales ABTS, revelando la presencia de péptidos antioxidantes en cada una de ellas, sin embargo, las fracciones de menor peso molecular (<1 kDa) mostraron la mayor capacidad secuestrante de radicales ABTS, tanto para los hidrolizados con Alcalasa y Esperasa (Figura 17).



**Figura 17.** Capacidad secuestrante de radicales ABTS de las fracciones peptídicas de los hidrolizados con Alcalasa y Esperasa. Diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0.05$ )

Como se mencionó anteriormente, numerosos estudios han demostrado que la actividad antioxidante de los hidrolizados está fuertemente relacionada con su distribución de tamaños moleculares, siendo las fracciones de menor peso molecular las que han mostrado la mayor actividad. Guo *et al.* (2009) demostraron que la fracción de menor peso molecular (<1 kDa) obtenida a partir de proteína de jalea real, mostró mayor actividad antioxidante en comparación al resto de fracciones (1-3 kDa, >3 kDa). Gómez-Guillén *et al.* (2010) también encontraron la mayor capacidad captadora de radicales ABTS en la fracción de menor peso molecular (<1 kDa), obtenida a partir del hidrolizado de gelatina de túnica de calamar, mediante ultrafiltración.

#### 6.2.5.4. *Relación entre la composición de aminoácidos y la actividad antioxidante de las fracciones peptídicas*

Las fracciones peptídicas fueron sometidas a un análisis de aminoácidos con el fin de determinar el posible efecto del perfil de aminoácidos en la actividad antioxidante (Tabla 10). La glicina fue el aminoácido más abundante en todas las fracciones como cabía esperar, ya que la túnica de calamar está compuesta principalmente por colágeno. A pesar de que los aminoácidos más abundantes en todas las fracciones fueron Gly, Glu, Ala, Asp, Ser, Arg, Pro e Hyp, independientemente de la enzima utilizada, algunas diferencias fueron notables. Así, el contenido de Ala, Leu y Tyr fue mayor en las fracciones peptídicas de menor peso molecular, mientras que el contenido de Asp, Glu y Gly se concentró en las fracciones peptídicas de mayor peso molecular. La Hyp también mostró tendencia a concentrarse en los péptidos de mayor tamaño, probablemente debido a que este aminoácido proporciona átomos adicionales capaces de formar puentes de hidrógeno y estabilizar la estructura de triple hélice, lo que dificulta la hidrólisis enzimática (Gómez-Guillén *et al.*, 2010). El contenido de aminoácidos hidrofóbicos fue similar en todas las fracciones, independientemente de la enzima usada para la hidrólisis (520-530 residuos/1000 residuos). El contenido de aminoácidos hidrofóbicos ha sido relacionado con la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos en algunas ocasiones. En el caso de los péptidos de gelatina, la abundancia de

aminoácidos hidrofóbicos en sus secuencias parece ser responsable de su elevada capacidad para prevenir la oxidación lipídica al compararlos con las secuencias de otros péptidos antioxidantes, debido a un incremento de su solubilidad en lípidos (Mendis *et al.*, 2005b). Por el contrario, los hidrolizados de gelatina de calamar gigante presentan menor contenido de aminoácidos hidrofóbicos que los obtenidos a partir de gelatinas de otras especies marinas, y sin embargo, los hidrolizados de gelatina de calamar han mostrado tener una mayor actividad antioxidante (Alemán *et al.*, 2011a). Dávalos *et al.* (2004) trabajaron en la actividad antioxidante de los aminoácidos por separado y encontraron que Trp, Tyr y Met mostraban la mayor actividad, seguido por Cys, His y Phe.

**Tabla 10.** Composición de aminoácidos de las fracciones peptídicas

Aminoácido	Nº residuos/1000 residuos					
	Alcalasa			Esperasa		
	3-10 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa	3-10 kDa	1-3 kDa	< 1 kDa
<b>Asp</b>	74	69	54	74	70	54
<b>Thr</b>	37	38	42	35	38	46
<b>Ser</b>	61	63	71	62	66	77
<b>Glu</b>	93	92	76	93	92	72
<b>Gly</b>	251	247	224	258	248	219
<b>Ala</b>	79	84	95	80	88	101
<b>Cys</b>	2	2	1	1	1	1
<b>Val</b>	25	26	29	23	24	30
<b>Met</b>	15	16	19	15	16	21
<b>Ile</b>	19	19	21	18	19	23
<b>Leu</b>	40	43	55	37	42	57
<b>Tyr</b>	12	13	18	11	12	19
<b>Phe</b>	18	18	22	17	17	23
<b>Hyl</b>	12	12	10	13	11	8
<b>His</b>	10	11	13	9	10	14
<b>Lys</b>	27	29	38	24	28	39
<b>Arg</b>	54	56	65	54	55	64
<b>Hyp</b>	71	66	41	74	65	39
<b>Pro</b>	75	76	67	78	74	64
<b>Σ Hidrofóbicos</b>	523	529	531	527	527	537

El resto de aminoácidos no mostraron actividad alguna. Basado solo en el contenido de estos aminoácidos en las fracciones peptídicas, podrían esperarse ligeras diferencias en la actividad antioxidante de estas fracciones. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la fracción peptídica <1 kDa mostró la mayor actividad antioxidante, determinada por ABTS, en ambos hidrolizados. De acuerdo a otros estudios, además del perfil de aminoácidos y del peso molecular, la secuencia de aminoácidos de los péptidos puede contribuir en gran medida a la actividad antioxidante observada (Suetsuna, 2000).

#### 6.2.5.5. Actividad antihipertensiva de las fracciones peptídicas

La actividad antihipertensiva se determinó mediante la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina-I (ACE). La concentración de péptidos requerida para inhibir el 50% de la actividad de la ACE (IC<sub>50</sub>) se detalla en la Tabla 11. Las actividades inhibidoras de la ACE de las fracciones separadas de los hidrolizados con Alcalasa y Esperasa variaron en función del peso molecular. Las fracciones de menor peso molecular (<1 kDa) mostraron el efecto más potente, con un IC<sub>50</sub> de ~ 51 y 93 µg/mL para Esperasa y Alcalasa, respectivamente. Los valores de IC<sub>50</sub> de las fracciones peptídicas con pesos moleculares entre 1-3 y 3-10 kDa fueron 3 y 1.5 veces más altos que los obtenidos en la fracción <1 kDa en el caso de Esperasa y Alcalasa, respectivamente. Es por esto que la ultrafiltración parece ser un método eficiente para concentrar la actividad inhibidora de la ACE en hidrolizados de túnica de calamar con Alcalasa y Esperasa. (Zhao *et al.*, 2007) también encontraron la mayor actividad inhibidora de la ACE en la fracción <1 kDa de un hidrolizado de gelatina de *Acaudina molpadioidea*. Del mismo modo, (Jung *et al.*, 2006a) encontraron la actividad inhibidora de la ACE más potente en la fracción peptídica de menor tamaño obtenida mediante ultrafiltración a partir del hidrolizado de proteína de *Limanda aspera*. Sin embargo, existen otros estudios, en los cuales los péptidos muy pequeños, aparentemente no incrementaron la actividad del hidrolizado entero, sino que la disminuyeron (Theodore & Kristinsson, 2007). Con respecto a las fracciones de túnica de

calamar, todas ellas presentaron mayor actividad inhibidora de la ACE en comparación con los hidrolizados enteros preparados con Alcalasa y Esperasa, los cuales presentaron valores de  $IC_{50}$  en un rango de concentraciones entre 340 y 890  $\mu\text{g/mL}$  (Alemán *et al.*, 2011b). La principal diferencia con el estudio de Alemán *et al.* (2011b) consiste en que las tónicas fueron sometidas a hidrólisis enzimática sin una extracción previa de gelatina. Aunque la relación estructura-actividad de los péptidos inhibidores de la ACE procedentes de fuentes alimenticias no ha sido establecida plenamente, una correlación entre los diferentes péptidos inhibidores de la ACE apuntan a que su actividad está fuertemente relacionada con el tripéptido c-terminal de su cadena de aminoácidos. La enzima ACE parece preferir sustratos o inhibidores competitivos que posean principalmente residuos de aminoácidos hidrofóbicos en las 3 posiciones c-terminal (Murray & FitzGerald, 2007). Otros estudios han demostrado que la Pro en la antepenúltima posición de la secuencia peptídica también favorece la unión con la enzima ACE (Contreras *et al.*, 2009). Muchos de los inhibidores comerciales (Captopril y Enalapril) también tienen un residuo de Pro en su estructura. La alta actividad inhibidora de la ACE encontrada en las fracciones peptídicas obtenidas con Alcalasa y Esperasa puede estar relacionada con el alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos en su composición (más de 500/1000 residuos), así como el alto contenido de Pro (64-78 residuos/1000 residuos) en estas fracciones peptídicas.

**Tabla 11.** Capacidad inhibidora de la ACE de las fracciones peptídicas. Diferentes letras (a, b, c, d, e) indican diferencias significativas entre las muestras.

	<b>Fracción peptídica</b>	<b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu\text{g}</math> proteína/mL)</b>
	< 1 kDa	$93.1 \pm 1.6^b$
<b>Alcalasa</b>	1-3 kDa	$130.1 \pm 8.6^c$
	3-10 kDa	$142.8 \pm 0.1^d$
	< 1 kDa	$51.1 \pm 11.0^a$
<b>Esperasa</b>	1-3 kDa	$150.3 \pm 3.7^e$
	3-10 kDa	$151.3 \pm 2.3^e$

#### 6.2.5.6. Actividad antimicrobiana de las fracciones peptídicas

La actividad antimicrobiana de las fracciones peptídicas se detalla en la Tabla 12. Entre las cepas microbianas probadas, *B. Cereus*, *B. coagulans* y *D. hansenii* fueron las más sensibles. Gómez-Guillén *et al.* (2010) encontraron actividad antimicrobiana en fracciones peptídicas obtenidas a partir de gelatinas de atún y calamar (1-10 kDa y <1 kDa hidrolizadas con Alcalasa), tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas, incluyendo aquellos microorganismos responsables del deterioro del pescado, tales como *S. putefaciens* y *P. phosphoreum*. En el presente estudio la actividad antimicrobiana contra estas dos bacterias fue leve o insignificante, sin embargo las fracciones fueron activas contra *P. fluorecens*, especialmente las fracciones <3 kDa. Péptidos antimicrobianos tales como myxinidin obtenido de la mucosa epidérmica del mixino o pez bruja, *Myxine glutinosa* L. (Subramanian *et al.*, 2009) y Cm-p1, purificado a partir de la serpiente marina (*Cenchritis muricatus*) López-Abarrategui *et al.* (2012), han demostrado la capacidad de prevenir el crecimiento de levaduras como *Candida albicans*, entre otras. Con respecto a la actividad antimicrobiana de las fracciones peptídicas, varios factores deben ser tomados en cuenta, tales como la composición de aminoácidos, la secuencia, peso molecular, características estructurales como la helicidad de los péptidos, hidrofobicidad, carga, etc. (Dathe & Wieprecht, 1999; Di Bernardini *et al.*, 2011). La actividad antimicrobiana ha sido asociada con el contenido de aminoácidos hidrofóbicos, los cuales, como se mencionó anteriormente, son abundantes en los hidrolizados de túnica de calamar (Tabla 10). La actividad de la mayoría de los péptidos antimicrobianos en términos generales se debe a una interacción con la membrana celular del microorganismo y las diferencias existentes en la composición de la membrana condicionan el modo de acción y la especificidad de los compuestos antibacterianos (Hancock & Patrzykat, 2002). Por otra parte, las interacciones electrostáticas entre los péptidos con carga positiva y los lípidos aniónicos de la superficie de los microorganismos, así como la hidrofobicidad y flexibilidad del péptido, son esenciales para ejercer su actividad antimicrobiana (Jenssen *et al.*, 2006). Aunque las fracciones obtenidas en el presente estudio fueron más efectivas contra bacterias Gram



positivas, también mostraron actividad contra bacterias Gram negativas y levaduras (Tabla 12).

**Tabla 12.** Actividad antimicrobiana de las fracciones peptídicas de túnica de calamar (5 mg/mL)

Cepa	Alcalasa			Esperasa		
	3-10 kDa	1-3 kDa	<1 kDa	3-10 kDa	1-3 kDa	<1 kDa
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	±	±	-	±	±
<i>Aspergillus niger</i>	-	±	±	-	±	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	+++	+++	-	+++	+++
<i>Bacillus coagulans</i>	±	+++	++	-	+++	++
<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>sp. lactis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-	+	++	-	++	+
<i>Brochotrix</i> <i>thermosphacta</i>	-	-	±	-	±	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-	-	±
<i>Debaromyces hansenii</i>	-	++	++	±	+++	++
<i>Enterococcus faecium</i>	-	±	-	-	±	-
<i>Escherichia coli</i>	-	±	+	-	+	+
<i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i>	-	-	-	-	+	±
<i>Lactobacillus helveticus</i>	-	±	-	-	±	-
<i>Listeria innocua</i>	±	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	±	-	-	-	-
<i>Penicillium expansum</i>	-	-	-	-	±	-
<i>Photobacterium</i> <i>phosphoreum</i>	-	±	±	-	±	±
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	±	-	±	-	±	-
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	-	+	++	-	++	++
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	±	±	-	±	±
<i>Shewanella</i> <i>putrefaciens</i>	-	-	-	-	±	-
<i>Sigella sonnei</i>	±	-	±	-	±	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	±	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	±	+	-	-	±
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-	-	±	-

Las proteasas utilizadas para la hidrólisis determinan el tamaño y la secuencia de los péptidos resultantes, y pueden por lo tanto afectar a su actividad. Las fracciones peptídicas obtenidas con Alcalasa y Esperasa fueron eficaces contra algunas cepas probadas, sin grandes diferencias entre ellas.

La actividad de las fracciones estudiadas está relacionada con sus tamaños moleculares, siendo la fracción de 3-10 kDa la que no mostró actividad alguna, mientras que la actividad antimicrobiana fue similar para las fracciones peptídicas de 1-3 kDa y <1 kDa (Tabla 12). Según Gómez-Guillén *et al.* (2010) las fracciones de menor peso molecular presentan menos agregados y favorecen una mejor exposición de los aminoácidos y sus cargas, facilitando de este modo la interacción con las membranas bacterianas.

#### **6.2.6. Conclusión**

Se han obtenido hidrolizados con actividades biológicas a partir de túnicas de calamar deshidratadas, sometidas directamente a hidrólisis enzimática sin necesidad de una extracción previa de gelatina, lo que permite a la industria reducir costes y tiempo de proceso. La desecación de estos materiales colagenosos parece ser un método apropiado para la conservación de esta materia prima a largo plazo, lo que implica importantes ventajas económicas en comparación al método de congelación. La ultrafiltración resultó ser un método eficiente que incrementó la actividad antioxidante, inhibidora de la ACE y antimicrobiana, tanto en los hidrolizados con Alcalasa como con Esperasa, concentrándose las mayores actividades en las fracciones de menor tamaño molecular. Esperasa fue tan efectiva como Alcalasa en la producción de hidrolizados con las actividades estudiadas.

### 6.2.7. Bibliografía

Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011a). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 407-413.

Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santín, E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011b). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 334-341.

Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011c). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(4), 1044-1051.

Benjakul, S., & Morrissey, M. T. (1997). Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3423-3430.

Chen, H. -, Muramoto, K., & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(3), 574-578.

Contreras, M. d. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566-573.

Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1-2), 71-87.

Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of food protection*, 67(9), 1939-1944.

Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307.

Diniz, F. M., & Martin, A. M. (1996). Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 31(5), 419-426.

Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009a). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976-983.

Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, M. P. (2009b). Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 585-592.

Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2005). Storage of dried fish skins on quality characteristics of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 958-963.

Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Alemán, A., López de Lacey, A., Giménez, B., & Montero, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *Sea by-products as raw material: New ways of application*, 89-115.

Guo, H., Kouzuma, Y., & Yonekura, M. (2009). Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry*, 113(1), 238-245.

Hancock, R. E. W., & Patrzykat, A. (2002). Clinical development of cationic antimicrobial peptides: From natural to novel antibiotics. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, 2(1), 79-83.

Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 491-511.

Jeon, Y. -, Byun, H. -, & Kim, S. -. (1999). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35(5), 471-478.

Jia, J., Zhou, Y., Lu, J., Chen, A., Li, Y., & Zheng, G. (2010). Enzymatic hydrolysis of alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(4), 635-640.

Jung, W. -, Mendis, E., Je, J. -, Park, P. -, Byeng, W. S., Hyung, C. K., Yang, K. C., & Kim, S. -. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 94(1), 26-32.

Khantaphant, S., & Benjakul, S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 151(4), 410-419.

Kim, S. -, Byun, H. -, Park, P. -, & Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2992-2997.

- Lin, L., & Li, B. -. (2006). Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin. *Journal of the science of food and agriculture*, 86(14), 2290-2295.
- López-Abarrategui, C., Alba, A., Silva, O. N., Reyes-Acosta, O., Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A., Migliolo, L., Costa, M. P., Costa, C. R., Silva, M. R. R., Garay, H. E., Dias, S. C., Franco, O. L., & Otero-González, A. J. (2012). Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie*, 94(4), 968-974.
- Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. -. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 581-587.
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current pharmaceutical design*, 13(8), 773-791.
- Park, P. -, Jung, W. -, Nam, K. -, Shahidi, F., & Kim, S. -. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6), 651-656.
- Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-Péron, M., Vandanjon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., Guérard, F., Chabeaud, A., LeGal, Y., Alvarez, O. M., Bergé, J., Piot, J., Batista, I., Pires, C., Thorkelsson, G., Delannoy, C., Jakobsen, G., Johansson, I., & Bourseau, P. (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(11), 1819-1826.
- Subramanian, S., Ross, N. W., & MacKinnon, S. L. (2009). Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L. *Marine Biotechnology*, 11(6), 748-757.
- Suetsuna, K. (2000). Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. *Marine Biotechnology*, 2(1), 5-10.
- Theodore, A. E., & Kristinsson, H. G. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibition of fish protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolate. *Journal of the science of food and agriculture*, 87(12), 2353-2357.
- Wu, H. -, Chen, H. -, & Shiau, C. -. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9-10), 949-957.
- Yang, J. -, Ho, H. -, Chu, Y. -, & Chow, C. -. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*, 110(1), 128-136.

Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X., & Zeng, M. (2007). Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry*, 42(12), 1586-1591.

**NANOENCAPSULACIÓN DE FRACCIONES PEPTÍDICAS  
ACTIVAS PROCEDENTES DE ESCAMAS DE DORADA  
(*Sparus aurata*)**





### 6.3.1. Resumen

Las escamas de dorada (*Sparus aurata*) se sometieron a hidrólisis enzimática con Esperasa y se aisló la fracción peptídica de peso molecular <3 kDa (F3). Esta fracción (F3) se encapsuló en nanoliposomas fabricados con fosfatidilcolina parcialmente purificada (PC). Concentraciones de 3.1% y 1 mg/mL de PC y F3, respectivamente, fueron seleccionadas como las mejores condiciones de encapsulación de F3 mediante la metodología de superficie de respuesta. La eficiencia de encapsulación y el potencial zeta de los liposomas fue de  $74.6 \pm 0.9\%$  y  $-40.78 \pm 0.67$  mV, respectivamente. El tamaño de los liposomas estuvo comprendido en un rango entre 62.2 y 214.2 nm, con un diámetro medio de 90.3 nm y un índice de polidispersidad de 0.25. Tanto la actividad antioxidante como la actividad inhibidora de la angiotensina I (ACE) de la fracción peptídica encapsulada (L-F3) se mantuvo constante durante los 8 días que estuvo en conservación a 4° C. La encapsulación preservó las actividades biológicas de F3 y por lo tanto puede ser una alternativa para mejorar la estabilidad de estos compuestos al aplicarlos en un producto alimenticio.

### 6.3.2. Introducción

El colágeno es la proteína más abundante en vertebrados y constituye alrededor del 25% del total de proteínas (Ogawa *et al.*, 2004). El colágeno y gelatina extraídos de diferentes fuentes se han descrito como una excelente materia prima para la obtención de hidrolizados y péptidos con actividades biológicas importantes, tales como antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva, o antitumoral (Di Bernardini *et al.*, 2011; Alemán *et al.*, 2011c; Lin *et al.*, 2012). Las escamas de pescado, principalmente compuestas por fibras de colágeno tipo I e hidroxapatita, son usualmente desechadas por la industria procesadora de pescado (Nomura *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2011). Sin embargo este subproducto puede ser utilizado para la obtención de productos de alto valor añadido. Por este motivo, las escamas de diferentes especies de peces, tales como el pez lagarto, sardina o gallineta han sido estudiadas como materia prima para la extracción de colágeno y gelatina (Harada *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008; Wangtueai & Noomhorm, 2009a). Además, las escamas de pescado han sido descritas como fuente de péptidos biológicamente activos con actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina I (ACE) (Fahmi *et al.*, 2004).

Los liposomas son estructuras coloidales compuestas de una o más bicapas lipídicas, habitualmente fosfolípidos, encapsulando un volumen de medio acuoso. Éstos pueden ser preparados a partir de compuestos de origen natural, tales como la lecitina, que constituye una fuente de fosfatidilcolina (PC) rica y económica (Mertins *et al.*, 2008). La encapsulación de compuestos bioactivos en liposomas puede ofrecer una solución potencial a la mejora de su eficacia y estabilidad en aplicaciones alimentarias, mediante su protección contra una serie de cambios ambientales y químicos, tales como pH y temperaturas extremas así como altas concentraciones iónicas (Mozafari *et al.*, 2008b). Esta técnica ha sido ampliamente estudiada dentro del emergente campo de la bionanotecnología, para la liberación controlada de compuestos bioactivos (da Silva Malheiros *et al.*, 2010). En la industria alimentaria, los liposomas han sido utilizados para encapsular proteínas, enzimas, vitaminas, antioxidantes,

minerales y saborizantes (Rao *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 2005; Mozafari *et al.*, 2008b). Más recientemente, los nanoliposomas han sido investigados por su capacidad de incorporar bacteriocinas como la nisina con resultados prometedores (Were *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2007; da Silva Malheiros *et al.*, 2010). Sin embargo, la encapsulación en liposomas no ha sido aplicada para la nanoencapsulación de péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la ACE, y publicaciones acerca de la encapsulación de péptidos antioxidantes son muy escasas (Maherani *et al.*, 2012).

### **6.3.3. Objetivo**

El objetivo de este trabajo fue la encapsulación de una fracción peptídica procedente de colágeno de escamas de dorada en nanoliposomas fabricados a partir de fosfatidilcolina, parcialmente purificada a partir de lecitina de soja. Se determinó la eficiencia de encapsulación, tamaño medio y estabilidad de los liposomas en los que se incluyeron los péptidos. Se analizó la actividad antioxidante y la actividad inhibidora de la ACE, tanto de la fracción peptídica libre como de la encapsulada.

#### 6.3.4. Metodología experimental

Escamas de dorada (*Sparus aurata*) obtenidas de residuos industriales, fueron utilizadas como materia prima para la obtención de un hidrolizado peptídico con actividades biológicas.

Las escamas fueron sometidas a un tratamiento con alcohol isobutílico al 10% con el fin de eliminar cualquier compuesto lipídico que pudiera estar presente en la muestra.

A continuación se realizó una desmineralización de las escamas, sumergiéndolas en una solución de EDTA 0,5N durante toda la noche. A continuación se lavaron con agua y se trataron con ácido acético 0,05M (Apartado 5.1.3).

Las escamas desmineralizadas se sometieron a un proceso de hidrólisis enzimática, utilizando el cóctel enzimático comercial Esperasa durante 3 horas a 60 °C (Apartado 5.3.2).

El hidrolizado obtenido fue sometido a ultrafiltración utilizando una membrana de corte de 3 kDa (Apartado 5.4). En la fracción obtenida se evaluó su actividad antioxidante mediante su capacidad secuestradora de radicales ABTS y su actividad antihipertensiva mediante su actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina-I (ACE) (Apartados 5.5.1 y 5.5.2).

La fracción <3 kDa obtenida fue encapsulada en nanoliposomas de fosfatidilcolina por el método de hidratación de la película (Apartado 5.7.2). Para la optimización del proceso de encapsulación se utilizó un diseño factorial de tres niveles:  $3^2$  con 3 puntos centrales. Con la ayuda del software informático Statgraphics Centurion XV para Windows se analizó el efecto de estos dos factores: concentración de la fracción peptídica y concentración de fosfatidilcolina en los 11 tratamientos. En la tabla 13, se detallan las combinaciones de concentración de la fracción peptídica y concentración de fosfatidilcolina para cada uno de los ensayos, así como el orden en que se hicieron dichas pruebas.

**Tabla 13.** Pruebas generadas por el diseño experimental.

	Fosfatidilcolina (%)	Fracción peptídica (mg/mL)
<b>1</b>	3	2
<b>2</b>	1.5	2
<b>3</b>	3	3
<b>4</b>	3	2
<b>5</b>	4.5	2
<b>6</b>	4.5	3
<b>7</b>	3	2
<b>8</b>	4.5	1
<b>9</b>	1.5	1
<b>10</b>	3	1
<b>11</b>	1.5	3

En cada una de las pruebas se determinaron el tamaño medio de los liposomas, la estabilidad mediante el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación (Apartados 5.7.4 y 5.7.5).

Tras el análisis estadístico se determinó el tratamiento óptimo, el mismo fue nuevamente caracterizado tomando en cuenta el tamaño medio de los liposomas, el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación. Adicionalmente se determinó la actividad antioxidante y antihipertensiva de la fracción peptídica encapsulada, con el fin de determinar alguna pérdida en las actividades de la fracción.

### 6.3.5. Resultados y discusión

#### 6.3.5.1. Contenido de proteínas y cenizas de las escamas desmineralizadas

El contenido de cenizas de las escamas de dorada fue del 59.8%. El rendimiento de las escamas desmineralizadas fue del  $43.7 \pm 0.67\%$ . El contenido de proteínas y cenizas de las escamas desmineralizadas fue de  $90.44 \pm 0.33\%$  y  $0.116 \pm 0.002\%$ , respectivamente. La desmineralización de las escamas de pescado usando EDTA fue por lo tanto un método efectivo para solubilizar los cristales de hidroxiapatita mediante la quelación de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  en solución (Pati *et al.*, 2010), produciendo un material adecuado para la subsecuente hidrólisis enzimática.

#### 6.3.5.2. Composición de aminoácidos de la fracción peptídica

El perfil de aminoácidos de la fracción peptídica  $<3$  kDa obtenida (F3) se detalla en la Tabla 14. Dado que la proteína de las escamas de pescado está compuesta principalmente por colágeno (Zylberberg *et al.*, 1992), la Gly fue el aminoácido más abundante ( $\sim 33\%$ ). Se observó también un elevado contenido en iminoácidos (Pro+Hyp), alrededor del  $\sim 19\%$ , mientras que el Trp no fue detectado. Además, se encontraron contenidos relativamente altos de Ala, Glu, Asp, Ser y Arg, mientras que los contenidos de Tyr, His o Hyl fueron bajos. Se pudieron encontrar además residuos de Cys, a pesar de que este aminoácido no forma parte de la estructura del colágeno tipo I (Morales *et al.*, 2000), probablemente procedentes de otras proteínas del estroma.



**Tabla 14.** Perfil de aminoácidos de F3

<b>Aminoácido</b>	<b>Número de residuos/1000 residuos</b>
<b>Asp</b>	41
<b>Thr</b>	28
<b>Ser</b>	64
<b>Glu</b>	66
<b>Gly</b>	326
<b>Ala</b>	123
<b>Cys</b>	1
<b>Val</b>	14
<b>Met</b>	14
<b>Ile</b>	4
<b>Leu</b>	18
<b>Tyr</b>	4
<b>Phe</b>	14
<b>His</b>	5
<b>Lys</b>	25
<b>Arg</b>	48
<b>Pro</b>	108
<b>Hyp</b>	90
<b>Hyl</b>	7
<b>Σ Hidrofóbicos*</b>	622

\* Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Met, Leu, Phe

#### 6.3.5.3. Optimización de la encapsulación de la fracción <3 kDa (F3)

La fracción peptídica F3 fue encapsulada dentro de nanovesículas fabricadas a partir de fosfatidilcolina de lecitina de soja parcialmente purificada. Con el fin de determinar el mejor tratamiento para la encapsulación se analizaron dos factores experimentales: la concentración de PC (1-4.5% w/v) y la concentración de péptidos F3 (1-3 mg/mL). El tamaño medio de los liposomas resultantes, medidos mediante DLS fueron entre 84 y 123 nm. No se encontraron diferencias significativas en el diámetro de las nanovesículas obtenidas con las diferentes concentraciones de PC y F3 ( $p > 0.05$ ). Taylor *et al.* (2007) describieron un incremento en el tamaño de liposomas fabricados con PC al incorporar nisina. Sin embargo, la concentración de nisina no estaba directamente relacionada con el incremento en el tamaño, ya que los liposomas

con 5mg/mL de nisina mostraron mayor diámetro que los que se elaboraron con una solución de 10 mg/mL de esta sustancia. Las condiciones de sonicación se han descrito como uno de los principales factores que afecta el tamaño de los liposomas (Silva *et al.*, 2008; Honary & Zahir, 2012). Silva *et al.* (2008) describieron que tanto el tamaño de los liposomas como la polidispersidad decrecían con el incremento de la amplitud, dado que se transmitía mayor energía a la solución. En este estudio la amplitud y el tiempo de sonicación se mantuvieron constantes en todos los casos.

**Tabla 15.** Modelo de regresión estimada de la relación entre la eficiencia de encapsulación (EE) (variable de respuesta) y la concentración de fosfatidilcolina y de la fracción peptídica (variables independientes).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>Radio-F</i>	<i>Valor-P</i>
A	18.67	1	18.67	8.57	0.0069
B	2393.99	1	2393.99	1098.55	0.0000
AA	19.53	1	19.53	8.96	0.0058
AB	7.63	1	7.63	3.50	0.0722
BB	635.06	1	635.06	291.42	0.0000
Error total	58.84	27	2.18		
Total (corr.)	3119.89	32			

$$R^2 = 0.9811; R^2 \text{ (Ajustado para d.f.)} = 0.9776$$

Por el contrario, la eficiencia de encapsulación (EE) decreció significativamente con el aumento de la concentración de F3. La EE mostró un incremento muy rápido y una disminución posterior a concentraciones crecientes de PC, con un alto coeficiente de regresión ( $r^2 = 0.9811$ ), indicando la bondad del modelo predictivo en el rango de variables experimentales seleccionado (Tabla 15, Figura 18a). Como se detalla en la tabla 15, existe una significación para los coeficientes lineales y cuadráticos, pero no para los coeficientes de la

interacción. La respuesta óptima predictiva obtenida fue de EE 67.7%, con una formulación seleccionada de 3.85% de PC y 1 mg/mL de F3.

Con respecto a la estabilidad de las nanovesículas, se encontraron diferencias significativas para la respuesta del potencial zeta, dependiendo de las concentraciones de PC y F3, mostrando un coeficiente de regresión de  $r^2 = 0.9383$  (Tabla 16, Figura 18b). En este caso, la respuesta fue significativa para los coeficientes lineales, cuadráticos y sus interacciones. A menores concentraciones de F3 (1mg/mL), el potencial zeta se incrementó al principio y disminuyó a medida que las concentraciones de PC aumentaban. Sin embargo, a altas concentraciones de F3 (3 mg/mL), el potencial zeta disminuyó junto al incremento de la concentración de PC. La respuesta predictiva óptima (-39.49 mV) fue establecida con valores de 1 mg/mL y 2.89% para F3 y PC, respectivamente.

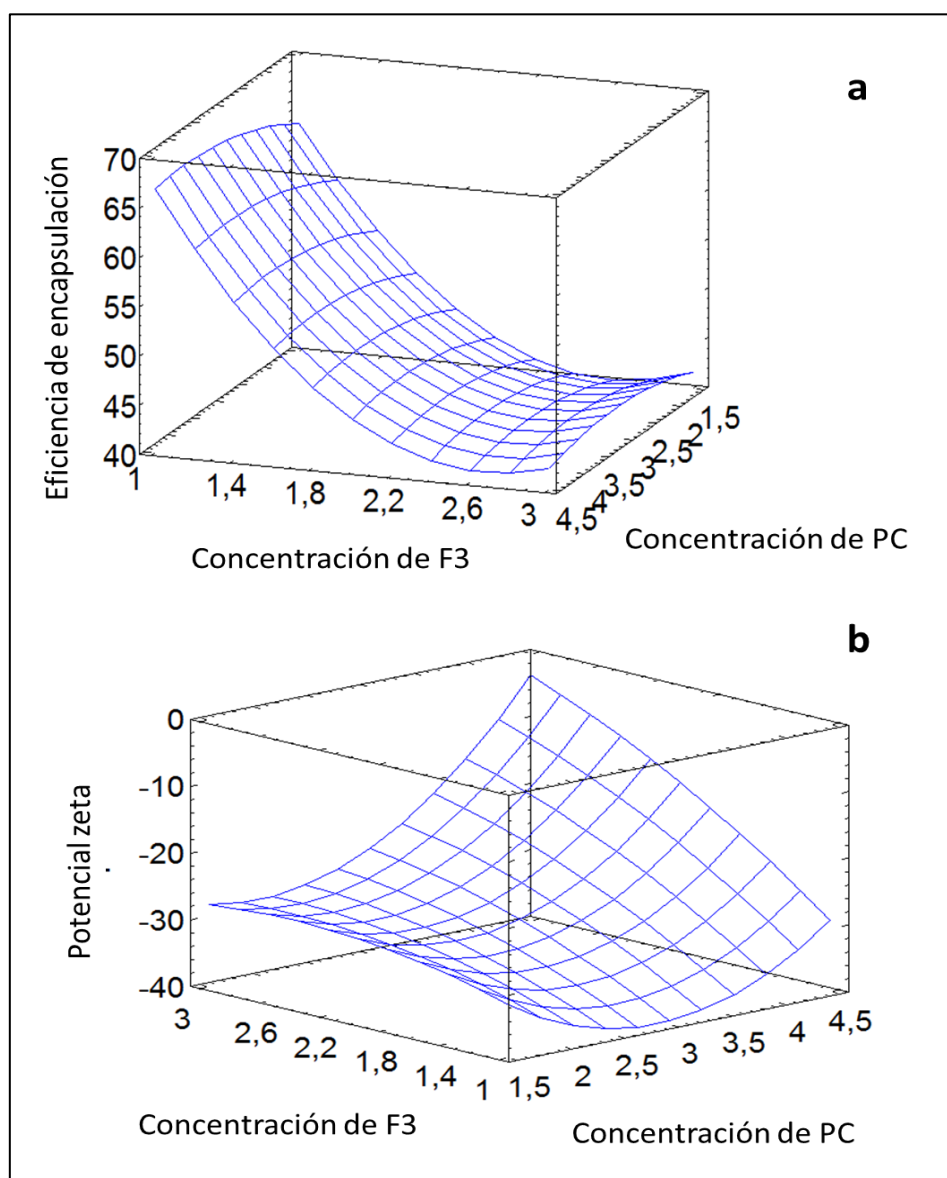
**Tabla 16.** Modelo de regresión estimada de la relación entre potencial zeta (variable de respuesta) y la concentración de PC y F3 (variables independientes).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>Radio-F</i>	<i>Valor-P</i>
A	827.97	1	827.974	121.31	0.0000
B	1039.22	1	1039.22	152.26	0.0000
AA	583.65	1	583.65	85.51	0.0000
AB	355.01	1	355.01	52.01	0.0000
BB	41.08	1	41.08	6.02	0.0209
Error total	184.29	27	6.83		
Total (corr.)	2990.15	32			

$R^2 = 0.9384$ ;  $R^2$  (ajustado para d.f.) = 0.9270

Con estos resultados, se llevó a cabo una optimización multi-respuesta, con el fin de determinar el mejor tratamiento, mediante el cual se puedan obtener

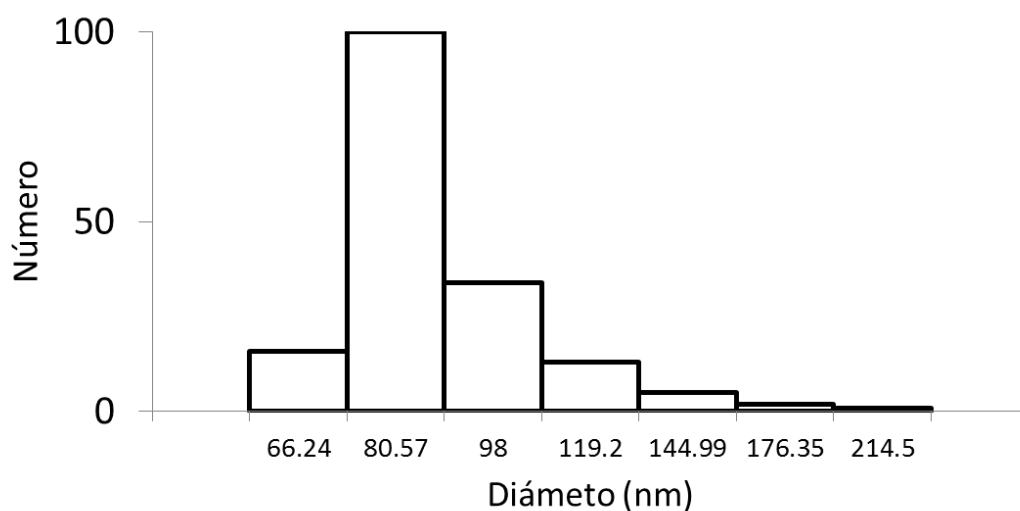
nanovesículas con buena estabilidad y una alta eficiencia de encapsulación. Concentraciones de 3.1% y 1 mg/mL para PC y F3, respectivamente, fueron establecidas como el mejor tratamiento para este experimento, con valores predictivos de -39.3 mV y 67.83% para potencial Z y eficiencia de encapsulación, respectivamente.



**Figura 18.** Eficiencia de encapsulación (a) y potencial zeta (b) en función de la concentración de Fosfatidilcolina (PC) y de la fracción peptídica (F3)

#### 6.3.5.4. Caracterización del producto optimizado

Las condiciones óptimas generadas por el modelo predictivo fueron llevadas a cabo experimentalmente y se caracterizaron los liposomas de PC conteniendo F3. Para ello se determinó el diámetro medio, la eficiencia de encapsulación y el potencial zeta de los liposomas obtenidos con 3.1% y 1 mg/mL de PC y F3, respectivamente. La eficiencia de encapsulación fue de  $74.6 \pm 0.9\%$ , valor muy cercano al valor propuesto por el modelo predictivo. Los valores de EE descritos en la literatura son muy variables, dependiendo de la composición de la vesícula y del compuesto encapsulado, y se han descrito valores entre  $<20\%$  y  $>90\%$  (Colas *et al.*, 2007; da Silva Malheiros *et al.*, 2010). La concentración de compuestos que pueden ser encapsulados viene condicionada por las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre los fosfolípidos y los péptidos. Valores similares de EE a los obtenidos en este estudio fueron descritos por (Were *et al.*, 2003), para calceína encapsulada en liposomas de PC (71%).



**Figura 19.** Distribución de tamaños de los liposomas determinada por DLS.

La distribución de tamaños de los liposomas estuvo comprendida en un rango entre 66.2 y 214 nm de diámetro (Figura 19) con un valor medio de 90.3 nm y un índice de polidispersidad de 0.25, lo cual indica que la polidispersidad de los liposomas es baja. Este valor es esperado para sistemas preparados a partir de materiales biológicos, en los cuales, la polidispersidad suele estar en un rango

entre 0.2 y 0.3 (da Silva Malheiros *et al.*, 2011). Were *et al.* (2003) describieron un diámetro medio de 84.9 y 124 nm para liposomas de PC encapsulando calceína y nisina respectivamente; mientras que da Silva Malheiros *et al.* (2010) describieron un diámetro medio de 137.7 nm para nanovesículas de PC conteniendo nisina.

Los liposomas de PC encapsulando F3 presentaron un potencial zeta de  $-40.78 \pm 0.67$  mV, valores bastante cercanos a los obtenidos en el modelo predictivo. El potencial zeta es utilizado como índice de estabilidad de las partículas, ya que mide la carga de la superficie de los liposomas (Hans & Lowman, 2002). Altos valores de potencial zeta (positivos o negativos) incrementan las interacciones repulsivas y reducen la frecuencia de las colisiones entre las partículas, lo que brinda una alta estabilidad a la suspensión de liposomas (da Silva Malheiros *et al.*, 2010). De acuerdo a Müller *et al.* (2001) un potencial zeta de  $\pm 30$  mV es el requerido para conseguir una nanosuspensión físicamente estable, estabilizada únicamente mediante repulsión electrostática. La composición de fosfolípidos, junto con las interacciones entre los fosfolípidos y los péptidos encapsulados, puede determinar la carga de la superficie de los liposomas. Se han descrito valores de -8.3 mV para vesículas vacías de PC (Taylor *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque la PC parcialmente purificada utilizada en este estudio, además de un alto contenido de PC, ésta contiene otros lípidos que pueden modificar la carga de la membrana (da Silva Malheiros *et al.*, 2011). Liposomas preparados con el mismo lípido utilizado en este estudio mostraron valores de potencial zeta de -52.28 mV y -27.42 mV respectivamente, conteniendo nisina y el péptido antimicrobiano P34 (da Silva Malheiros *et al.*, 2010; da Silva Malheiros *et al.*, 2011). En el presente estudio, el potencial zeta de los liposomas conservados durante 8 días a 4° C fue de  $-34.20 \pm 2.74$  mV. Esta disminución casi insignificante confirma la estabilidad de las nanovesículas encapsulantes de los péptidos de la fracción F3.

#### 6.3.5.5. Actividades antioxidante y antihipertensiva de la fracción peptídica F3 antes y después de la encapsulación

La actividad antioxidante de la fracción peptídica F3, evaluada mediante ABTS fue de  $27.73 \pm 0.5$  mg VCEAC/g de proteína. Similares resultados se han descrito para hidrolizados de gelatina obtenidos mediante hidrólisis enzimática de subproductos ricos en colágeno procedentes de otras especies marinas, tales como pieles y túnicas de calamar (Giménez *et al.*, 2009a; Alemán *et al.*, 2011a). La distribución de pesos moleculares de F3 fue evaluada mediante cromatografía de exclusión molecular. El cromatograma mostró un pico mayoritario, siendo los péptidos con peso molecular de aproximadamente 3200 Da los más abundantes. En la literatura se pueden encontrar resultados variables cuando la actividad antioxidante se relaciona con el tamaño molecular de los hidrolizados peptídicos, pero en general elevadas actividades antioxidantes se encuentran en fracciones peptídicas con bajo peso molecular. Bougatef *et al.* (2009) observaron que las fracciones peptídicas de peso molecular inferior a 3.5 kDa obtenidas de musola lisa (*Mustelus mustelus*) mostraron la mayor capacidad de secuestro del radical DPPH. Wu *et al.* (2003) descubrieron que la fracción alrededor de 1400 Da mostraba la mayor actividad antioxidante, en comparación a las fracciones de 900 y 200 Da de hidrolizados de macarela pintoja (*Scomber austriasicus*). Además, la actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos ha sido positivamente relacionada con el alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos (alrededor del 60% en F3 en este estudio), lo cual podría incrementar su solubilidad en lípidos y por lo tanto mejorar su actividad antioxidante (Chen *et al.*, 1995).

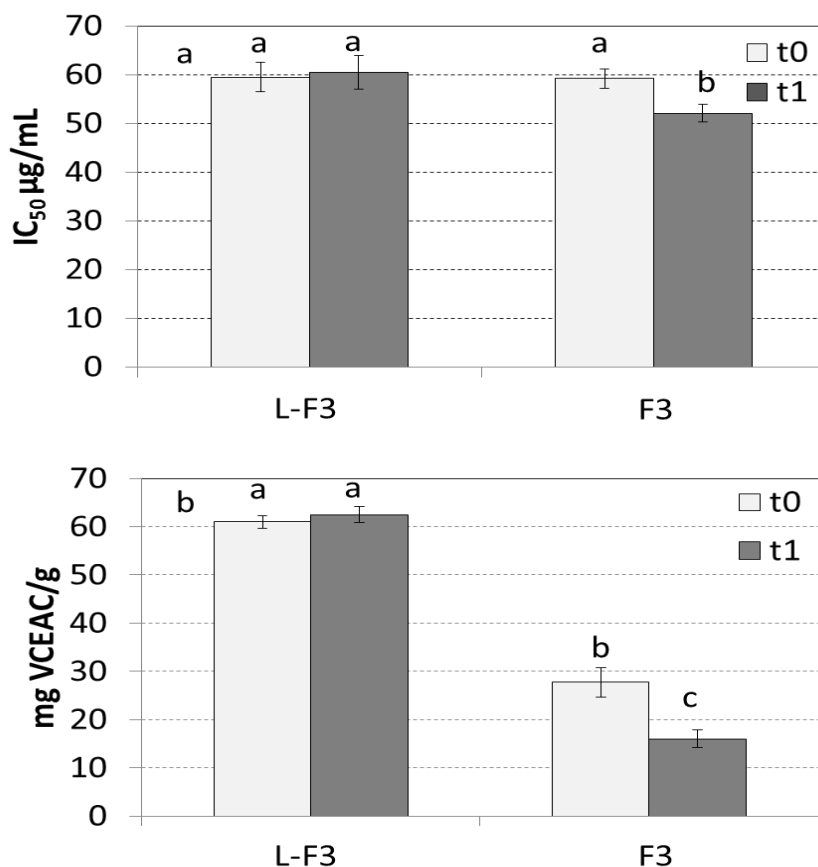
La actividad antihipertensiva se determinó mediante la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina-I (ACE). La concentración de F3 requerida para inhibir el 50% de la actividad de la ACE ( $IC_{50}$ ) fue de  $59.2 \pm 3$   $\mu$ g/mL. Fahmi *et al.* (2004) publicaron un valor  $IC_{50}$  de 96  $\mu$ g/mL para la fracción peptídica de menor peso molecular de hidrolizados de dorada, obtenida mediante separación por filtración en gel. Byun & Kim (2001) fraccionaron hidrolizados de gelatina de piel de abadejo de Alaska mediante ultrafiltración (10, 5 y 1 kDa) y

podieron observar que la actividad inhibidora de la ACE incrementaba significativamente cuanto menor era el peso molecular de la fracción peptídica. En este caso, estos autores describieron una actividad de 0.63 mg/mL para la fracción <1 kDa. Sin embargo, la actividad inhibidora de la ACE de los hidrolizados proteicos no solo depende del tamaño de la fracción peptídica, sino también puede ser influenciada por la secuencia de los péptidos. Aunque la relación estructura-actividad de los péptidos inhibidores de la ACE procedentes de fuentes alimenticias no ha sido totalmente establecida, una correlación entre los diferentes péptidos inhibidores de la ACE indican que la unión de esta enzima con el sustrato se ve fuertemente influida por la secuencia del tripéptido C-terminal del sustrato o inhibidor. Se ha descrito además que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en las tres posiciones C-terminal favorecen la unión con la enzima (Cheung *et al.*, 1980; Murray & FitzGerald, 2007). También se ha sugerido que la presencia de Pro en la cadena peptídica puede incrementar significativamente la actividad inhibidora de la ACE (Quirós *et al.*, 2007; Pihlanto *et al.*, 2008; Contreras *et al.*, 2009). Estas dos características podrían explicar en parte la alta actividad inhibidora de la ACE encontrada en F3, así, de acuerdo al análisis de aminoácidos (Tabla 14), F3 tiene un 60% de aminoácidos hidrofóbicos y un considerable contenido de Pro (> 10%).

La actividad antioxidante e inhibidora de la ACE de la fracción peptídica encapsulada (L-F3) se mantuvo constante tras 8 días conservada a 4° C (Figura 20 a y b). Sin embargo tanto la capacidad secuestrante de radicales ABTS como el IC<sub>50</sub> de la actividad inhibidora de la ACE decrecieron alrededor de un 42.2% y 13.6% respectivamente, en la fracción peptídica sin encapsular (F3;  $p < 0.05$ ). Estos cambios en las actividades son signo del deterioro de los péptidos, debido principalmente a causas microbiológicas. Al tiempo 0, LF3 mostró aproximadamente 2 veces más actividad antioxidante que F3. Esta diferencia puede ser atribuida a la capacidad secuestrante de radicales ABTS de la PC, ya que aunque la actividad antioxidante de la PC es muy inferior a la de F3 (2.6 mg VCEAC/g PC vs. 27.73 mg VCEAC/g proteína), las



concentraciones de PC fueron 30 veces mayores (30 mg PC/mL vs. 1 mg proteína/mL).



**Figura 20.** Capacidad secuestrante de radicales ABTS y actividad inhibidora de la ACE de la fracción peptídica libre y encapsulada (F3 y L-F3), inmediatamente después de la preparación de los liposomas (t0) y tras 8 días de almacenamiento a 8 °C (t1).

da Silva Malheiros *et al.* (2011) no encontraron diferencias significativas entre la actividad antimicrobiana del péptido P34 libre y el encapsulado almacenado a 24° C por 24 días, y, la actividad residual de la nisina encapsulada fue del 25% tras 10 días de almacenamiento, en comparación con la actividad antimicrobiana de la nisina libre. Sin embargo, de acuerdo a los resultados encontrados en el presente estudio, la mayoría de los trabajos coinciden en apreciar la mayor estabilidad de los péptidos encapsulados frente a los libres. En este sentido, se ha descrito que las actividades de las bacteriocinas se mantenían constantes durante 30 días al encapsularlas en nanovesículas de

PC, mientras que el 90% de la actividad inicial de las bacteriocinas libres se perdió desde el día 14 al 21 de almacenamiento (Teixeira *et al.*, 2008). Del mismo modo, Were *et al.* (2004) describieron que la nisina encapsulada en liposomas de PC inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes* de manera más eficaz en comparación con la nisina libre.

La encapsulación de diferentes compuestos, tales como péptidos antimicrobianos, dentro de liposomas, incrementa el tiempo de vida efectivo de estos compuestos, mediante la liberación gradual de los mismos (Taylor *et al.*, 2008). Por otra parte, la encapsulación en liposomas evita la degradación proteolítica así como interacciones con otros componentes alimenticios que pueden ocurrir cuando los péptidos antimicrobianos son directamente aplicados en los alimentos (da Silva Malheiros *et al.*, 2010).

#### **6.3.6. Conclusiones**

Los resultados del presente estudio indican que una fracción peptídica de bajo peso molecular procedente de un hidrolizado de colágeno puede ser eficientemente encapsulada en nanovesículas de PC. Tanto la eficiencia de encapsulación como la estabilidad de las nanovesículas dependen de la concentración de lípido y péptido en la solución. Sin embargo, estas variables no afectaron al tamaño de los liposomas en el rango de concentraciones probadas. La encapsulación preservó las actividades biológicas de la fracción peptídica, y puede ser una alternativa para mejorar la estabilidad de estos compuestos cuando se aplican a productos alimenticios.

### 6.3.7. Bibliografía

- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011a). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 407-413.
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudín, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011b). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(4), 1044-1051.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), 1198-1205.
- Byun, H. -, & Kim, S. -. (2001). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*, 36(12), 1155-1162.
- Chen, H. -, Muramoto, K., & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(3), 574-578.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., & Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401-407.
- Colas, J. -, Shi, W., Rao, V. S. N. M., Omri, A., Mozafari, M. R., & Singh, H. (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38(8), 841-847.
- Contreras, M. d. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566-573.
- da Silva Malheiros, P., Micheletto, Y. M. S., Silveira, N. P. d., & Brandelli, A. (2010). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43(4), 1198-1203.
- Da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Micheletto, Y. M. S., Da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: Physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3545-3552.

- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307.
- Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H. C., Shigematsu, T., Kida, K., & Uemura, Y. (2004). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39(10), 1195-1200.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976-983.
- Hans, M. L., & Lowman, A. M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 319-327.
- Honary, S., & Zahir, F. (2012). Effect of process factors on the properties of doxycycline nanovesicles. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 169-175.
- Lin, L., Lv, S., & Li, B. (2012). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. *Food Chemistry*, 131(1), 225-230.
- Mertins, O., Sebben, M., Schneider, P. H., Pohlmann, A. R., & Da Silveira, N. P. (2008). Characterization of soybean phosphatidylcholine purity by <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR. *Quimica Nova*, 31(7), 1856-1859.
- Morales, J., Montero, P., & Moral, A. (2000). Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2142-2148.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 833-844.
- Müller, R. H., Jacobs, C., & Kayser, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 3-19.
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current pharmaceutical design*, 13(8), 773-791.
- Nomura, Y., Sakai, H., Ishii, Y., & Shirai, K. (1996). Preparation and some properties of type I collagen from fish scales. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(12), 2092-2094.
- Ogawa, M., Portier, R. J., Moody, M. W., Bell, J., Schexnayder, M. A., & Losso, J. N. (2004). Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from

the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). Food Chemistry, 88(4), 495-501.

Pati, F., Adhikari, B., & Dhara, S. (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. Bioresource technology, 101(10), 3737-3742.

Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. J. (2008). ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). Food Chemistry, 109(1), 104-112.

Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., & Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. International Dairy Journal, 17(1), 33-41.

Rao, D., Chawan, C., & Veeramachaneni, R. (1994). LIPOSOMAL ENCAPSULATION OF  $\beta$ -GALACTOSIDASE: COMPARISON OF TWO METHODS OF ENCAPSULATION AND IN VITRO LACTOSE DIGESTIBILITY. Journal of Food Biochemistry, 18(4), 239-251.

Silva, R., Little, C., Ferreira, H., & Cavaco-Paulo, A. (2008). Incorporation of peptides in phospholipid aggregates using ultrasound. Ultrasonics sonochemistry, 15(6), 1026-1032.

Taylor, T. M., Bruce, B. D., Weiss, J., & Davidson, P. M. (2008). *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition in vitro by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. Journal of Food Safety, 28(2), 183-197.

Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. Critical reviews in food science and nutrition, 45(7-8), 587-605.

Taylor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by  $\zeta$ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. Food Biophysics, 2(1), 1-9.

Teixeira, M. L., dos Santos, J., Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2008). Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9(1), 49-53.

Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., & Hu, Q. (2008). Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). Food Chemistry, 108(2), 616-623.

Wangtueai, S., & Noomhorm, A. (2009). Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida spp.*) scales. LWT - Food Science and Technology, 42(4), 825-834.

Were, L. M., Bruce, B., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2004). Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 67(5), 922-927.

Were, L. M., Bruce, B. D., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2003). Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8073-8079.

Wu, H. -, Chen, H. -, & Shiau, C. -. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9-10), 949-957.

Zylberberg, L., Bonaventure, J., Cohen-Solal, L., Hartmann, D. J., & Bereiter-Hahn, J. (1992). Organization and characterization of fibrillar collagens in fish scales in situ and in vitro. *Journal of cell science*, 103(1), 273-285.

**INCORPORACIÓN DE PÉPTIDOS NANOENCAPSULADOS CON  
ACTIVIDAD ANTIHIPERTENSIVA EN UN GEL DE GELATINA**





#### **6.4.1. Resumen**

Una fracción peptídica <1 kDa procedente de túnica de calamar, con actividad inhibidora de la ACE ( $IC_{50}$ ) de 95.8  $\mu\text{g/mL}$  fue encapsulada en nanoliposomas de fosfatidilcolina. La concentración peptídica afectó a la eficiencia de encapsulación y a la estabilidad de los péptidos, estableciéndose la concentración óptima en 1.75 mg/mL. Los liposomas obtenidos con esta concentración presentaron valores de eficiencia de encapsulación de 53%, potencial zeta de -59 mV y un tamaño medio de 70.3 nm, además demostraron ser estables en un rango de pH entre 3 y 8. Los liposomas se incorporaron en un gel de gelatina sin perjuicio de las propiedades reológicas y la estabilidad térmica del gel. La actividad inhibidora de la ACE de los péptidos no se vio afectada tras el proceso de encapsulación e incorporación al gel de gelatina.

#### 6.4.2. Introducción

Los liposomas son estructuras coloidales compuestas de una o más bicapas lipídicas, y son utilizados para el transporte y liberación controlada de medicamentos, péptidos, proteínas, ADN plasmático, entre otros compuestos, para usos farmacéuticos, cosméticos o bioquímicos (Ulrich, 2002). Los liposomas elaborados con fosfolípidos tienen la capacidad de actuar como transportadores tanto para compuestos hidrofílicos como hidrofóbicos y han sido utilizados como un potencial sistema para la liberación controlada de medicamentos en enfermedades tumorales, terapias génicas y de silenciamiento, vacunación genética, inmunomodulación, y para la elaboración de productos tópicos (Verma *et al.*, 2010; Mufamadi *et al.*, 2011). En el campo de la industria alimentaria, los liposomas pueden ofrecer una solución potencial para mejorar la eficacia y estabilidad de sustancias bioactivas tales como proteínas, enzimas, vitaminas, antioxidantes, minerales y saborizantes, los cuales podrían ser incluidos en la formulación de alimentos funcionales (Rao *et al.*, 1994; Mozafari *et al.*, 2008b).

La gelatina es un polímero natural ampliamente utilizado en la industria en una amplia variedad de productos y comúnmente usada para aplicaciones médicas y farmacéuticas gracias a su biodegradabilidad y biocompatibilidad en ambientes fisiológicos (Young *et al.*, 2005). La gelatina en sí puede considerarse un alimento dietético de alta digestibilidad, ideal como complemento en ciertos tipos de dieta. Para fines tecnológicos, la gelatina puede ser utilizada como ingrediente para mejorar la elasticidad, la consistencia y la estabilidad de los alimentos, por lo que su funcionalidad depende en gran medida de sus propiedades reológicas (Stainsby, 1987). La gelatina contiene una mezcla de cadenas polipeptídicas de peso molecular diverso, producto de la desnaturalización del colágeno. Por enfriamiento, dichas cadenas tienden a reconstituir parcialmente la estructura triple-helicoidal típica del colágeno, formando una red de gel (de Wolf, 2003). La longitud de los enlaces cruzados y los puentes de hidrógeno formados durante la conformación de la red influye en gran medida en la resistencia de gel y la

estabilidad térmica, que son los principales indicadores de calidad de una gelatina comercial (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Sin embargo, las propiedades del gel pueden verse afectadas debido a la presencia de otros compuestos, tales como compuestos de bajo peso molecular u otros polímeros que pueden interactuar con las cadenas de gelatina (Harris *et al.*, 2003).

El uso de lípidos para reforzar sistemas de geles ha sido descrito para diferentes matrices proteicas, sugiriendo que, en sistemas no interactivos, las partículas lipídicas podrían llenar los poros de la matriz del gel sin interaccionar con la red proteica (Mor *et al.*, 1999). Existe un trabajo previo sobre incorporación de compuestos bioactivos encapsulados en liposomas dentro de geles de gelatina, favoreciendo la liberación de los mismos durante prolongados períodos de tiempo (Mufamadi *et al.*, 2011). Sin embargo, hay escasa información disponible acerca del efecto de los liposomas en las propiedades reológicas de geles de gelatina (Sakai *et al.*, 2007), especialmente enfocados hacia un sistema de alimento funcional.

El calamar gigante *Dosidicus gigas* es el más grande de la familia Ommastrephidae y es una especie endémica del Pacífico este (Markaida & Sosa-Nishizaki, 2001). El gran tamaño de su manto junto al hecho de que generalmente es comercializado como manto limpio y pelado, implica la generación de importantes cantidades de residuos colagenosos, que podían aprovecharse para la obtención de productos con alto valor añadido. Hidrolizados obtenidos a partir de gelatina de calamar gigante han mostrado tener excelentes actividades antioxidante y antihipertensiva (Alemán *et al.*, 2011a). Sin embargo, dentro del organismo, una gran cantidad de péptidos se degradan antes de alcanzar su objetivo (Palm *et al.*, 2006; Palm *et al.*, 2007). Por este motivo, la nanoencapsulación se ofrece como una solución para mejorar la eficacia y estabilidad de los péptidos protegiéndolos de factores ambientales y químicos (Malheiros *et al.*, 2012).

### **6.4.3. Objetivos**

Los objetivos del presente trabajo fueron: i) encapsular en nanoliposomas de fosfatidilcolina una fracción peptídica de bajo peso molecular ( $< 1\text{kDa}$ ), con actividad inhibidora de la ACE, procedente de túnicas de calamar gigante, y ii) estudiar el comportamiento reológico y la actividad antihipertensiva potencial del gel de gelatina adicionado de los liposomas.

#### 6.4.4. Metodología experimental

La fracción peptídica <1kDa obtenida de la hidrólisis de la túnica de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) desecada por aire forzado e hidrolizada con Esperasa, fue encapsulada en nanoliposomas de fosfatidilcolina mediante el método de hidratación de la película (Apartado 5.7.2).

Se probaron concentraciones de la fracción peptídica entre 0.5 y 3 mg/mL con el fin de establecer la concentración óptima a ser encapsulada. En cada una de las pruebas se determinaron el tamaño medio de los liposomas, la estabilidad mediante el potencial zeta y la eficiencia de encapsulación (Apartados 5.7.4 y 5.7.5).

Todas las muestras obtenidas fueron almacenadas a 4° C durante una semana, período tras el cual se repitieron los análisis de tamaño medio de los liposomas y potencial zeta.

Tras este análisis, se escogió el tratamiento que presentó las mejores características.

El tratamiento escogido fue nuevamente caracterizado tomando en cuenta el tamaño medio de los liposomas, el potencial zeta, la eficiencia de encapsulación, y su estabilidad a diferentes valores de pH (Apartado 5.7.6).

Diferentes concentraciones de los nanoliposomas encapsulando la fracción peptídica fueron incorporados en un gel de gelatina (Apartado 5.7.7). Se estudiaron las propiedades viscoelásticas de los geles obtenidos, con el fin de determinar el grado de interferencia de los liposomas incorporados, en las propiedades del gel (Apartado 5.2.2.1).

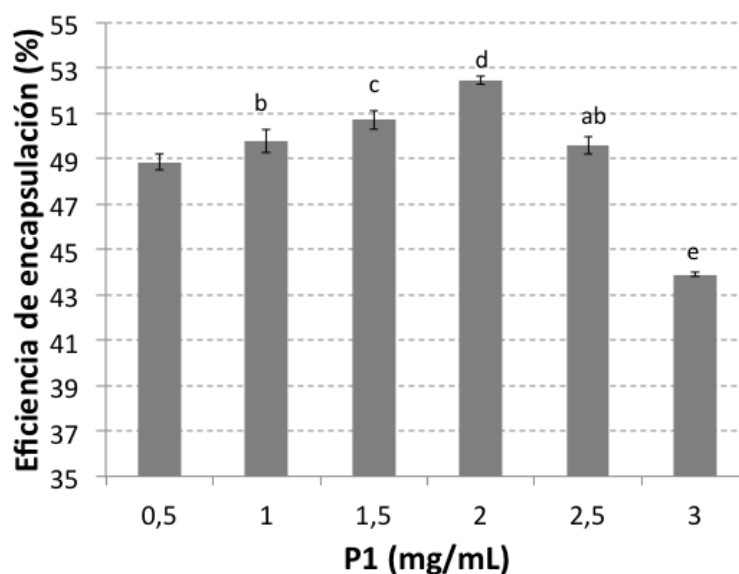
Finalmente se comparó la actividad inhibidora de la angiotensina-I (ACE) de la gelatina con nanoliposomas, con la mostrada por la fracción peptídica, calculando la actividad en función a la concentración de la fracción peptídica, con el fin de determinar si existió alguna pérdida de actividad durante todo el proceso.

### 6.4.5. Resultados y discusión

#### 6.4.5.1. Encapsulación de la fracción peptídica

Se probaron concentraciones crecientes (0.5 - 3 mg/mL) de la fracción peptídica < 1 kDa (P1) para ser encapsuladas en nanoliposomas fabricados a partir de fosfatidilcolina de soja parcialmente purificada.

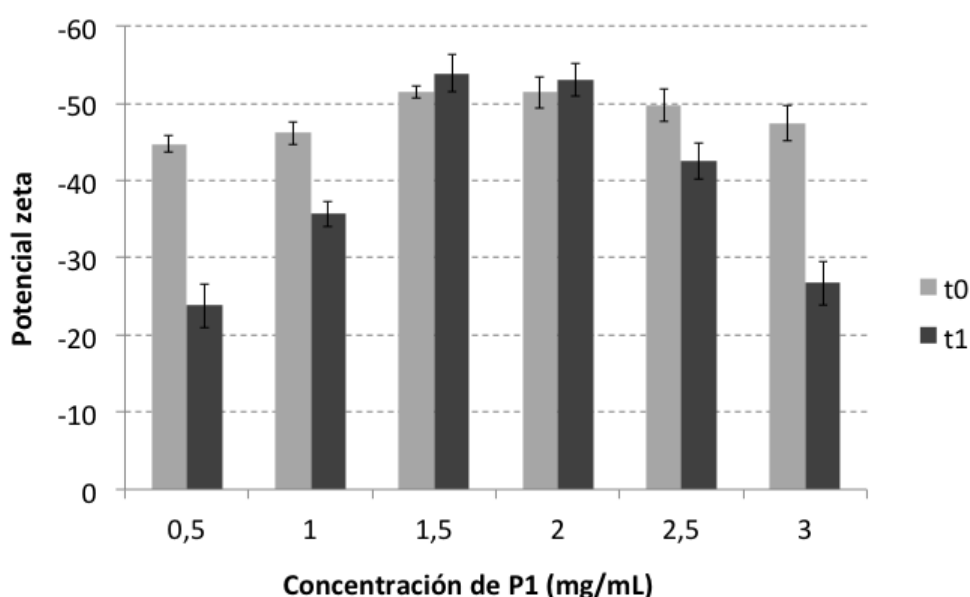
La eficiencia de encapsulación (EE) de P1 en liposomas se detalla en la Figura 21. Se obtuvieron valores comprendidos entre 43.96% para la concentración de 3 mg/mL y 52.46% con 2 mg/mL, lo que contradice la idea de que concentraciones crecientes de péptidos induzcan una mayor capacidad de encapsulación. Una eficiencia de encapsulación del 50% representa un valor intermedio entre las diferentes EE descritas en la literatura para liposomas fabricados con PC encapsulando compuestos de naturaleza peptídica (Perrett *et al.*, 1991; Were *et al.*, 2003; Vyas *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2008). La eficiencia de encapsulación depende del método de preparación, de la composición lipídica del material encapsulante, y el tipo de compuesto encapsulado, así como de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas que se establecen entre ambos (Riaz, 1996; Were *et al.*, 2003).



**Figura 21.** Eficiencia de encapsulación

La fracción peptídica P1 presenta aproximadamente un 53% de aminoácidos hidrofóbicos (datos no mostrados), lo que indica que una parte considerable de los péptidos se localiza en la fase acuosa interna del liposoma, mientras el resto, algo más abundante, se encontrará inmovilizado en las bicapas lipídicas a través de interacciones hidrofóbicas (Laridi *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2008).

El potencial zeta de los liposomas, medido inmediatamente después de ser preparados (t0) se modificó significativamente en función de la concentración de P1, con valores entre -45 y -51 mV (Figura 22). Con el fin de controlar la estabilidad de los liposomas en función del tiempo, se repitió el análisis en las mismas muestras, tras ser almacenadas durante una semana a 4 °C (t1). En este caso, la estabilidad fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) a 1.5 y 2 mg/mL, sin diferencias significativas entre estas dos concentraciones ( $p > 0.05$ ). El resto de concentraciones peptídicas ensayadas (Figura 22) exhibieron una pérdida significativa ( $p \leq 0.05$ ) de estabilidad de los liposomas en el tiempo.

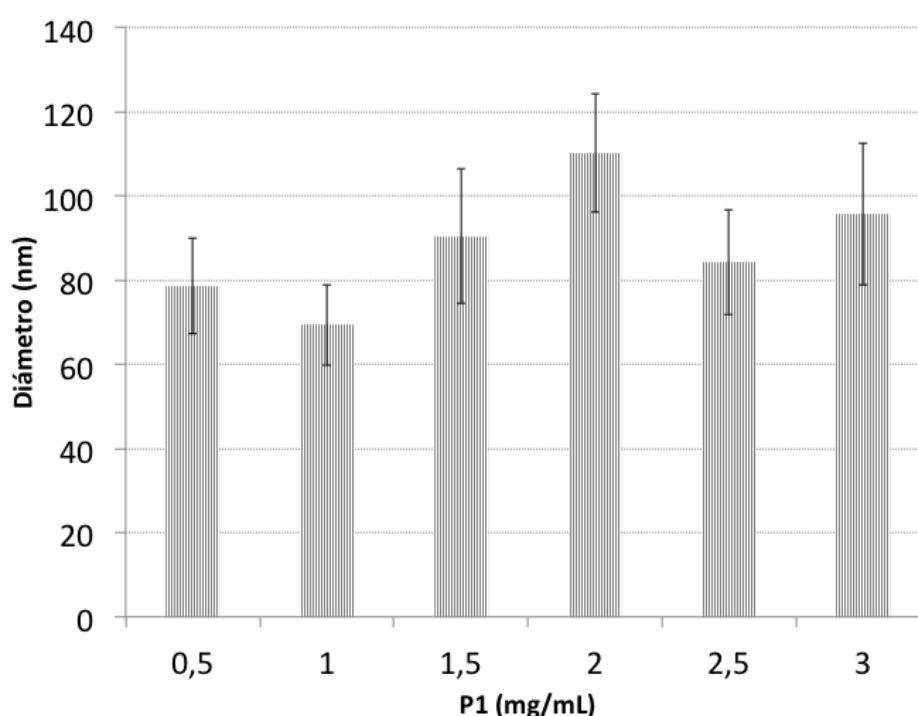


**Figura 22.** Potencial zeta. t0: potencial a tiempo inicial; t1: potencial después de 1 semana de almacenamiento a 4 °C

El potencial zeta es la medida de la carga de la superficie de los liposomas y es usado como índice de la estabilidad de las partículas (Hans & Lowman, 2002).



Cuando el potencial zeta es mayor que 30 mV o menor que -30 mV es posible obtener una nanodispersión físicamente estable, estabilizada únicamente mediante repulsiones electrostáticas que disminuyen la frecuencia de colisiones entre los liposomas (Müller *et al.*, 2001). En todos los tratamientos se determinaron altos valores de potencial zeta a t<sub>0</sub>, pero sólo las vesículas con concentraciones entre 1.5 y 2 mg/mL mantuvieron la estabilidad una semana después. Esto indica que esas concentraciones fueron las más apropiadas para obtener liposomas estables conteniendo la fracción peptídica.



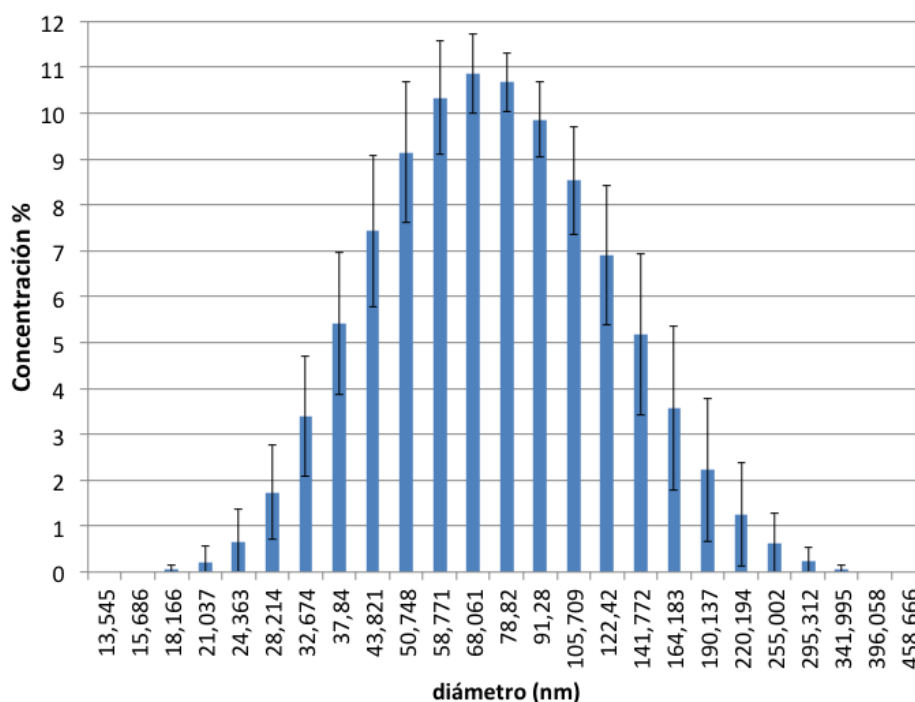
**Figura 23.** Diámetro medio de los liposomas

El diámetro medio de los liposomas en relación al incremento de la concentración de P1 se muestra en la Figura 23. Se obtuvieron tamaños de partícula medios entre 69 y 110 nm, sin poder establecerse una correlación entre el tamaño medio y la concentración de péptidos. De acuerdo con Taylor *et al.* (2007), el tamaño de los liposomas no parece estar directamente relacionado con el nivel de péptidos encapsulados. Tamaños medios de alrededor de 100 nm han sido igualmente descritos para liposomas de

fosfatidilcolina conteniendo péptidos cuyo peso molecular es notablemente más alto (lisozima ~ 14 kDa y nisina ~3.5 kDa) que el de la fracción peptídica del presente trabajo (< 1 kDa) (Were *et al.*, 2003; da Silva Malheiros *et al.*, 2011), lo cual sugiere que el peso molecular de los péptidos no es un factor relevante en el tamaño de las nanovesículas.

El tamaño de los liposomas es una característica importante a tomar en cuenta. Existe la evidencia de que cuanto menor sea el tamaño de los liposomas, más eficiente es la entrega de los compuestos encapsulados en el organismo (Nagayasu *et al.*, 1995; Nagayasu *et al.*, 1999; Ramezani *et al.*, 2009), aunque el transporte depende además de las propiedades de superficie de los lípidos utilizados (Malheiros *et al.*, 2012). El tamaño de partícula depende en gran medida de las condiciones de sonicación utilizadas al preparar los liposomas (Silva *et al.*, 2008; Honary & Zahir, 2012). En el presente estudio, este parámetro no constituyó una variable, ya que las condiciones de sonicación, optimizadas en un ensayo previo, fueron las mismas para todas las concentraciones ensayadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración de P1 más conveniente para ser encapsulada mediante fosfatidilcolina parece estar entre 1.5 y 2 mg/mL. Para afinar mejor la concentración, se prepararon y caracterizaron nuevos liposomas con 1.75 mg/mL de la fracción P1. Utilizando esta concentración se obtuvieron nanovesículas (L-P1) con una eficiencia de encapsulación de  $53.18 \pm 1.32$  %, potencial zeta de  $-58.8 \pm 2.91$  mV y un tamaño medio de partícula de  $70.3 \pm 6.03$  nm (Figura 24). La distribución del tamaño de partícula de L-P1 muestra un comportamiento uni-modal, con un índice de polidispersidad de  $0.215 \pm 0.021$ , valor muy aceptable y similar al informado previamente para liposomas de nisina (da Silva Malheiros *et al.*, 2011). Basados en estos resultados se escogió la concentración de 1.75 mg/mL como la más apropiada para los siguientes experimentos.



**Figura 24.** Distribución de tamaños de los liposomas con 1.75 mg/mL de P1

#### 6.4.5.2. Efecto del pH en la estabilidad de los nanoliposomas

La estabilidad de los liposomas al incorporarlos en sistemas alimentarios puede verse afectada por diferentes factores; entre ellos, el pH puede jugar un papel relevante. La estabilidad en función del pH de la fracción peptídica encapsulada (L-P1) se determinó disolviendo L-P1 en tampones a diferente pH (entre 1 y 8) durante 24 horas a  $4 \pm 0.5$  °C. La Tabla 17 muestra los valores de potencial zeta después de la incubación a diferentes pH valores de pH. LP-1 a pH 1 precipitó inmediatamente, indicando que el sistema se vuelve inestable y forma agregados muy rápidamente. Cierta inestabilidad fue observada también a pH 2 y 8, mostrando valores de potencial zeta de alrededor de -22.5 mV. Las nanovesículas, sin embargo, mostraron ser estables a un rango de pH entre 3 y 7, que es más habitual en la mayoría de los sistemas alimentarios. Esta es una característica muy importante, ya que indica que los liposomas obtenidos presentan alta capacidad para retener el material encapsulado en un rango amplio de pH. No obstante, el valor más alto de potencial zeta se obtuvo a pH 7

(-54.30 mV). De acuerdo con Taylor *et al.* (2005), la posible interacción de los péptidos con la membrana fosfolipídica puede ejercer un efecto estabilizador de las nanovesículas.

**Tabla 17.** Potencial zeta de LP-1 a diferentes valores de pH

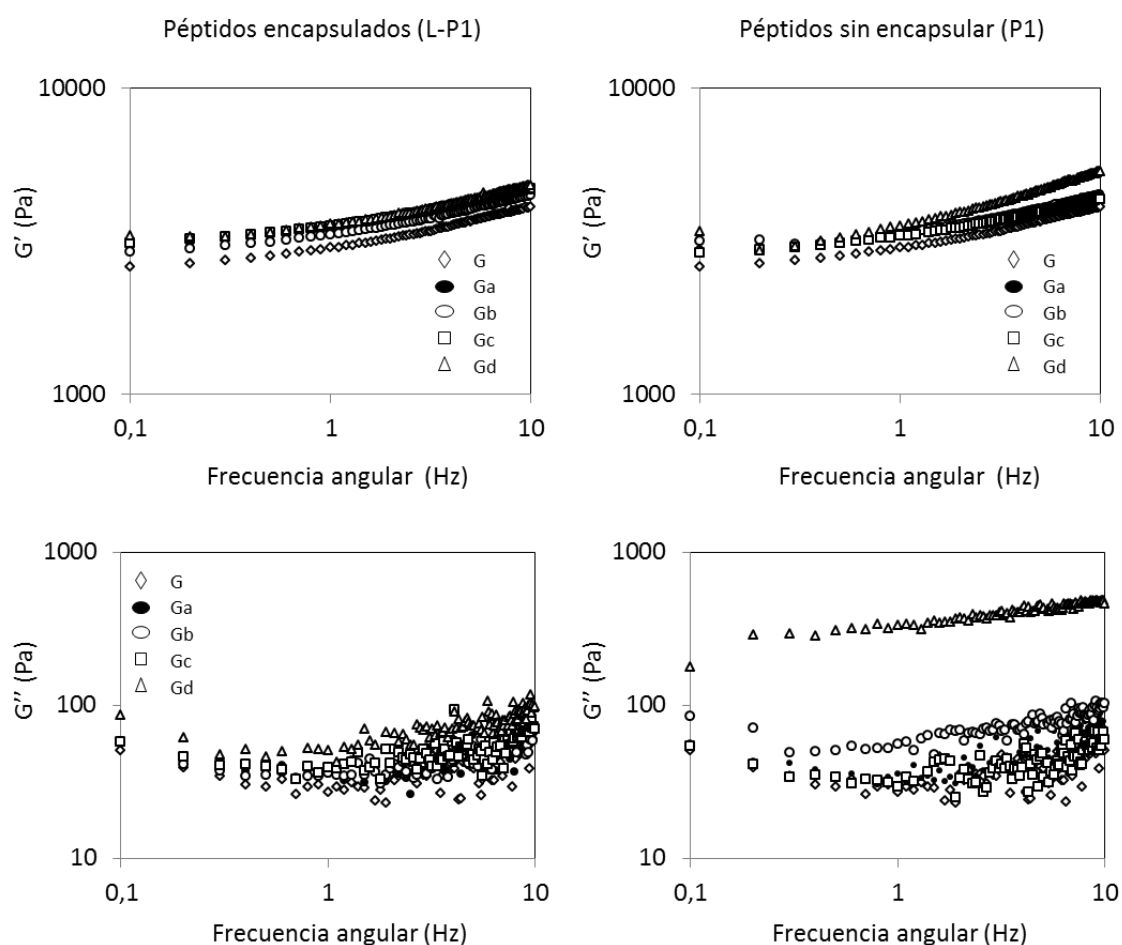
pH	Potencial Zeta (mV)	
8	-22.77	$\pm 1.88^a$
7	-54.30	$\pm 4.59^b$
6	-30.27	$\pm 0.85^c$
5	-32.23	$\pm 0.29^c$
4	-30.07	$\pm 1.02^c$
3	-41.77	$\pm 3.25^d$
2	-22.50	$\pm 0.62^a$
1	-2.06	$\pm 0.13^e$

#### 6.4.5.3. Incorporación de L-P1 en gelatina

Con el fin de determinar el grado de interferencia ejercida por L-P1 en la capacidad formadora de gel de la gelatina, se llevaron a cabo estudios de viscoelasticidad dinámica oscilatoria con concentraciones crecientes de L-P1, seleccionadas en base a conferir propiedades nutraceuticas al preparado de gelatina. Con fines comparativos, se prepararon y caracterizaron soluciones de gelatina sola (G) y soluciones de gelatina con la fracción peptídica sin encapsular (P1). Aunque el pH intrínseco de la solución de gelatina era alrededor de 5, el sistema de gelatina se ajustó a pH 7 con el fin de favorecer la estabilidad de los liposomas.

La dependencia de la frecuencia de los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) en el gel de gelatina adicionado de L-P1 y P1 se expone en la Figura 25. Todas las muestras presentaron un comportamiento típico de gel tras un breve período de maduración en frío, como se identifica mediante los valores de  $G' > G''$ . La gelatinas con P1 y L-P1 mostraron un ligero incremento en los valores de  $G'$  y  $G''$  a lo largo de todo el rango de frecuencias estudiado, en comparación con la gelatina sola, lo que indica un cierto reforzamiento del gel

producido por la presencia de las nanovesículas. No se encontraron variaciones definidas en función de las concentraciones peptídicas de P1 y L-P1 hasta una concentración de 13.12 mg/g (mg de péptidos por gramo de gelatina seca). Sin embargo, en la muestra con la fracción no encapsulada (P1), se observó un incremento notable en los valores de  $G'$  a frecuencias superiores a 1 Hz con la máxima concentración ensayada (26.24 mg/g).

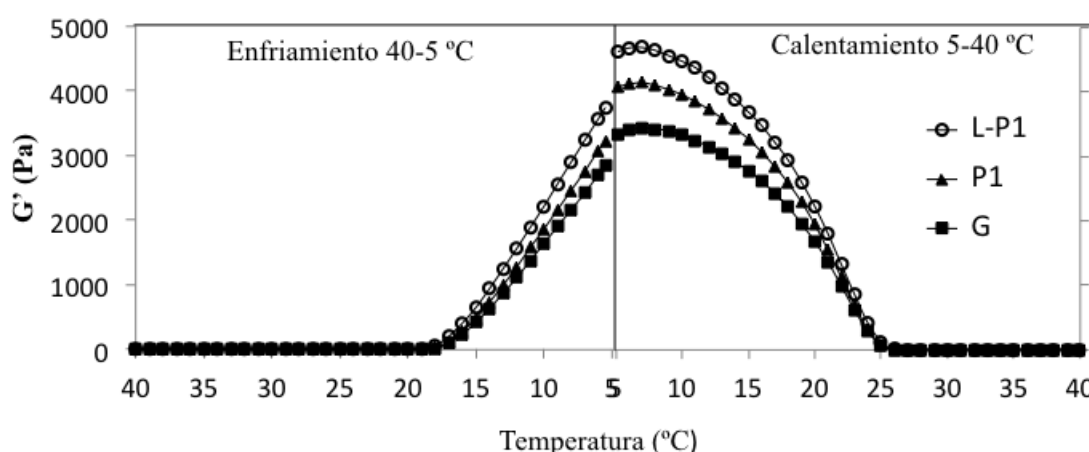


**Figura 25.** Propiedades viscoelásticas del gel en función de la frecuencia. G: gelatina sin péptidos. Ga a Gd: gelatina con péptidos (encapsulados o sin encapsular) expresado como mg de péptidos por gramo de gelatina seca: a=2.62 mg/g, b=6.56 mg/g, c=13.12 mg/g, d=26.24 mg/g.

Esta muestra presentó valores de  $G''$  notablemente superiores al resto, de hecho, fue la única capaz de ajustar el comportamiento del módulo viscoso a la ley de la potencia ( $R^2 = 0.93$ ). En cambio, los valores de  $G'$  de todas las

muestras pudieron modelarse exitosamente de acuerdo a la ley de la potencia ( $R^2 = 0.92-0.99$ ). El exponente del modelo  $n'$  está relacionado con la estabilidad estructural y la conformación de la red proteica: cuanto mayores sean los valores de  $n'$ , mayor será la inestabilidad de la matriz frente a los cambios de frecuencia. Para geles exhibiendo un comportamiento elástico ideal,  $n'$  será cercano a cero. El valor  $n'$  obtenido en el gel sin péptidos fue 0.12. El incremento de la concentración de L-P1 prácticamente no afectó el valor de  $n'$  en los geles resultantes, siendo de 0.11 en todos los casos, por lo que se deduce que la estabilidad estructural de la red del gel permaneció prácticamente inalterada por la presencia de las nanovesículas.

De igual manera, no se observaron cambios importantes cuando se incorporó P1 en concentraciones entre 2.62 y 13.12 mg/g (mg de péptidos por gramo de gelatina seca), ya que los valores de  $n'$  fueron de 0.10 - 0.11. Sin embargo, el gel con la máxima concentración de P1 (26.24 mg/g) incrementó considerablemente el valor de  $n'$  (0.19), lo que indica que la incorporación de la fracción peptídica sin encapsular a partir de determinada concentración, puede ser perjudicial para la estabilidad del gel, probablemente debido a interacciones entre los péptidos y las cadenas de gelatina al formar las triples hélices.



**Figura 26.** Propiedades viscoelásticas en función de la temperatura

El comportamiento de gelificación en frío de las soluciones de gelatina con P1 y L-P1 a la máxima concentración peptídica (26.24 mg/g), y fusión posterior del gel, fue determinado mediante la realización de una rampa de enfriamiento de 40 a 5 °C y una subsecuente rampa de calentamiento de 5 a 40 °C (Figura 26).

El incremento de  $G'$  inducido por el enfriamiento fue más evidente en las gelatinas que contenían L-P1 y P1 que en la gelatina sin péptidos añadidos (G), no afectándose la temperatura de gelificación y de fusión en ningún caso. Aunque la adición de P1 contribuyó a cierto reforzamiento del gel, el máximo incremento fue observado en la muestra de gelatina con L-P1. En concordancia con estos resultados, Thakur *et al.* (2010) observaron que cuando las partículas de aceite se encuentran bien dispersas en las emulsiones con gelatina en forma de “aceite-en-agua”, se produce un aumento de la fuerza de gel. Estudios previos también observaron un ligero incremento en la resistencia a la tracción de un gel de gelatina, tras incorporar liposomas al sistema (DiTizio *et al.*, 1998; DiTizio *et al.*, 2000). Al igual que en el presente trabajo, estos autores observaron que la presencia de los liposomas no afectaba la estabilidad térmica del gel.

#### 6.4.5.4. Actividad antihipertensiva

La actividad antihipertensiva se determinó mediante la inhibición de la enzima convertidora de la angiotensina-I (ACE). La concentración de P1 necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ACE ( $IC_{50}$ ) fue de  $95.8 \pm 5.1 \mu\text{g/mL}$ . Conviene destacar que no se detectó ninguna actividad inhibidora en la mezcla de la gelatina con el material de encapsulación. Cuando se incorporó la fracción de péptido encapsulado (L-P1) en la solución de gelatina, el valor de  $IC_{50}$ , calculado por  $\mu\text{g}$  de péptidos, fue  $90.5 \pm 8.5 \mu\text{g/mL}$ . Por lo tanto, se concluyó que ni el proceso de encapsulación ni la presencia de gelatina afectan de manera significativa la actividad inhibidora de la ACE de la fracción peptídica ( $p > 0.05$ ). Además, la encapsulación en liposomas permitió preservar las actividades biológicas de estos péptidos en el gel.

Con el fin de evaluar el potencial efecto antihipertensivo del gel con L-P1, se calculó el IC<sub>50</sub> tomando en cuenta los sólidos totales y el contenido en agua del mismo, y se determinó un valor de  $50.85 \pm 4.79$  mg/mL. Tomando en cuenta que el IC<sub>50</sub> del Enalapril© es 2.7 µg/mL (Aleman *et al.*, 2011c) y que esta droga es comercializada en presentaciones de 2.5, 5, 10 y 20 mg, se necesitaría una dosis de 94 g del gel de gelatina con L-P1 para emular una dosis de 5 mg de Enalapril©.



#### **6.4.6. Conclusiones**

Una fracción peptídica de pesos moleculares <1 kDa procedente de túnica de calamar gigante con elevada actividad inhibidora de la ACE fue exitosamente encapsulada en liposomas de fosfatidilcolina. Se encontró una dependencia de la eficiencia de encapsulación y el potencial zeta de las nanovesículas obtenidas con la concentración de la fracción peptídica a encapsular, si bien ésta no influyó claramente en el tamaño de las nanovesículas. Los liposomas, que probaron ser muy estables en un rango de pH entre 3 y 7, fueron incorporados en un sistema de gelatina, sin afectar las propiedades reológicas y la estabilidad térmica del gel madurado en frío. La actividad inhibidora de la ACE de la fracción peptídica no se vio mermada por el proceso de encapsulación o la presencia de gelatina.

#### 6.4.7. Bibliografía

Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011a). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 407-413.

Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudín, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011b). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(4), 1044-1051.

Da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Micheletto, Y. M. S., Da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: Physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3545-3552.

de Wolf, F. A. (2003). Chapter V Collagen and gelatin. In Anonymous Progress in Biotechnology(pp. 133-218). Elsevier.

DiTizio, V., Ferguson, G. W., Mittelman, M. W., Khoury, A. E., Bruce, A. W., & DiCosmo, F. (1998). A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters. *Biomaterials*, 19(20), 1877-1884.

DiTizio, V., Karlgard, C., Lilge, L., Khoury, A. E., Mittelman, M. W., & DiCosmo, F. (2000). Localized drug delivery using crosslinked gelatin gels containing liposomes: Factors influencing liposome stability and drug release. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(1), 96-106.

Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.

Hans, M. L., & Lowman, A. M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 319-327.

Harris, P., Normand, V., & Norton, I. T. (2003). GELATIN. In Editor-in-Chief: Benjamin Caballero, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition)(pp. 2865-2871). Oxford: Academic Press.

Honary, S., & Zahir, F. (2012). Effect of process factors on the properties of doxycycline nanovesicles. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 169-175.

Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. -, Vuilleumard, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13(4), 325-336.

- Malheiros, P. d. S., Sant'Anna, V., Barbosa, M. d. S., Brandelli, A., & Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International journal of food microbiology*, 156(3), 272-277.
- Markaida, U., & Sosa-Nishizaki, O. (2001). Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995-1997. *Fisheries Research*, 54(1), 63-82.
- Mishra, D., Mishra, P. K., Dubey, V., Nahar, M., Dabadghao, S., & Jain, N. K. (2008). Systemic and mucosal immune response induced by transcutaneous immunization using Hepatitis B surface antigen-loaded modified liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(4-5), 424-433.
- Mor, Y., Shoemaker, C. F., & Rosenberg, M. (1999). Compressive Properties of Whey Protein Composite Gels Containing Fractionated Milkfat. *Journal of Food Science*, 64(6), 1078-1083.
- Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008a). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18(4), 309-327.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008b). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 833-844.
- Mufamadi, M. S., Pillay, V., Choonara, Y. E., Du Toit, L. C., Modi, G., Naidoo, D., & Ndesendo, V. M. (2011). A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *Journal of drug delivery*, 2011.
- Müller, R. H., Jacobs, C., & Kayser, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 3-19.
- Nagayasu, A., SHIMOOKA, T., & KIWADA, H. (1995). Effect of Vesicle Size on in Viva Release of Daunorubicin from Hydrogenated Egg Phosphatidylcholine-Based Liposomes into Blood.
- Nagayasu, A., Uchiyama, K., & Kiwada, H. (1999). The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40(1-2), 75-87.
- Palm, C., Jayamanne, M., Kjellander, M., & Hällbrink, M. (2007). Peptide degradation is a critical determinant for cell-penetrating peptide uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(7), 1769-1776.

- Palm, C., Netzereab, S., & Hällbrink, M. (2006). Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides*, 27(7), 1710-1716.
- Perrett, S., Golding, M., & Williams, W. P. (1991). A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: Characterization of the liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43(3), 154-161.
- Ramezani, M., Khoshhamdam, M., Dehshahri, A., & Malaekheh-Nikouei, B. (2009). The influence of size, lipid composition and bilayer fluidity of cationic liposomes on the transfection efficiency of nanolipoplexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), 1-5.
- Rao, D., Chawan, C., & Veeramachaneni, R. (1994). LIPOSOMAL ENCAPSULATION OF  $\beta$  - GALACTOSIDASE: COMPARISON OF TWO METHODS OF ENCAPSULATION AND IN VITRO LACTOSE DIGESTIBILITY. *Journal of Food Biochemistry*, 18(4), 239-251.
- Riaz, M. (1996). Liposomes preparation methods. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 19(1), 65-77.
- Sakai, H., Sato, A., Takeoka, S., & Tsuchida, E. (2007). Rheological properties of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) suspended in a series of plasma-substitute solutions. *Langmuir*, 23(15), 8121-8128.
- Silva, R., Little, C., Ferreira, H., & Cavaco-Paulo, A. (2008). Incorporation of peptides in phospholipid aggregates using ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 15(6), 1026-1032.
- Stainsby, G. (1987). Gelatin gels. *Advances in meat research*. Collagen as food, 4, 209-222.
- Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(7-8), 587-605.
- Teixeira, M. L., dos Santos, J., Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2008). Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), 49-53.
- Thakur, G., Mitra, A., Basak, A., Rousseau, D., & Pal, K. (2010). Characterization of oil-in-water gelatin emulsion gels: Effect of homogenization time., 305-308.
- Ulrich, A. S. (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience reports*, 22(2), 129-150.

Verma, P., Ram, A., Jha, A., Mishra, A., & Thakur, A. (2010). Phosphatidylcholine: a revolution in drug delivery technology. *Int J Pharm Sci Res*, 1(2), 1-12.

Vyas, S. P. *et al.* (2005). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. *International journal of pharmaceutics*, 296(1–2), 80-86.

Were, L. M., Bruce, B. D., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2003). Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8073-8079.

Young, S., Wong, M., Tabata, Y., & Mikos, A. G. (2005). Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*, 109(1), 256-274.

**PELÍCULAS FUNCIONALES DE CASEINATO SÓDICO  
ENRIQUECIDAS CON PEPTIDOS BIOACTIVOS PROCEDENTES  
DE RESIDUOS DE CRUSTACEOS ENCAPSULADOS EN  
NANOVESÍCULAS**



### 6.5.1. Resumen

Langostinos (*Penaeus notialis*) enteros se sometieron a hidrólisis enzimática con tripsina y se aisló la fracción peptídica de peso molecular  $<3$  kDa (ST1). Esta fracción (ST1) se encapsuló en nanoliposomas fabricados con fosfatidilcolina parcialmente purificada (PC). Concentraciones de 5%, 5 mg/mL y 5% de PC, ST1 y glicerol, respectivamente, fueron utilizadas para la encapsulación de ST1 mediante el método de calentamiento. ST1 presentó una capacidad secuestrante de radicales ABTS de  $69.1 \pm 1.4$  mg VCEAC/g, una actividad inhibidora de la ACE ( $IC_{50}$ ) de  $69 \mu\text{g/mL}$  y una actividad inhibidora de la DPP-IV ( $IC_{50}$ ) de  $0.46 \pm 0.05$  mg/mL. La eficiencia de encapsulación y el potencial zeta de los liposomas encapsulando ST1 fue de  $52.37 \pm 2.38\%$  y  $-53.87 \pm 2.9$  mV, respectivamente mientras que liposomas vacíos, preparados bajo las mismas condiciones presentaron un potencial zeta de  $-44.37 \pm 2.85$  mV. El tamaño medio de los liposomas fue de  $99.98 \pm 4.2$  nm y  $\pm 2.4$  nm para los liposomas encapsulando ST1 y los liposomas vacíos, respectivamente. Estas vesículas se integraron uniformemente en películas comestibles elaboradas con caseinato de sodio, las cuales se tornaron más solubles en agua, sin perjuicio del espesor o de la transparencia.



### 6.5.2. Introducción

En el ámbito alimentario existe en la actualidad una creciente demanda de consumo de productos de origen natural, con capacidad bioactiva, baja toxicidad y preferiblemente amigables con el medioambiente. A nivel industrial, la valorización de residuos para la obtención de productos de alto valor añadido representa una ventaja económica a la vez que facilita las tareas de limpieza, depuración de vertidos y gestión de residuos.

La obtención de hidrolizados proteicos a partir de residuos de distintas especies de langostinos ha sido un área que ha recibido considerable atención en la última década (Gildberg & Stenberg, 2001). Dichos hidrolizados constituyen una fuente importante de péptidos bioactivos con capacidad antioxidante, antihipertensiva o saciante (Guerard *et al.*, 2007; Cudennec *et al.*, 2008; Cheung & Li-Chan, 2010). Recientemente, se ha descrito una patente sobre el uso de hidrolizados enzimáticos de pescado para la prevención o tratamiento del síndrome metabólico asociado con la obesidad (Duclos, 2013), sin embargo, no existe información sobre la obtención de hidrolizados proteicos de crustáceos con actividad hipoglucemiante, basada en la inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). La DPP IV, es una endopeptidasa con capacidad para inactivar la hormona GLP-1, la cual tiene la función de estimular la secreción de insulina dependiente de glucosa (Maes *et al.*, 2007). En pacientes con diabetes mellitus tipo II, se ha observado una baja concentración de GLP-1, derivada de una elevada actividad DPP IV, y un importante efecto terapéutico de sustancias inhibidoras de la DPP IV. Recientemente, Mochida *et al.* (2010), han descrito un importante efecto antiglicémico en ratones, vía inhibición de la DPP IV, de un hidrolizado de proteína de maíz.

Los péptidos bioactivos se ofertan como alternativa a las drogas sintéticas para la prevención o el tratamiento de ciertas enfermedades. Por lo general, no son tan eficaces como los agentes de síntesis, pero normalmente carecen de efectos adversos en el organismo, lo que permite aumentar la dosis de

ingestión e incorporarlos en la formulación de alimentos funcionales (Zhang, Li & Kim, 2012). La incorporación directa de los péptidos en productos alimentarios, sin embargo, plantea algunas dificultades, relacionadas principalmente con la falta de estabilidad de los péptidos por degradación proteolítica, por exposición a condiciones extremas de pH o temperatura, así como por su posible interacción con los componentes alimentarios (cationes divalentes, lípidos, proteínas), pudiendo ver reducida su actividad biológica (Aasen *et al.*, 2003; Chollet *et al.*, 2008; Mozafari *et al.*, 2008). Además, el tracto gastrointestinal constituye una barrera para la absorción de los principios activos. El ambiente ácido del estómago, la diversidad de enzimas intestinales, las condiciones de flujo gastrointestinal y las diversas capas de tejido epitelial reducen considerablemente la biodisponibilidad de los péptidos, por lo que también cobra gran interés el desarrollo de dispositivos basados en biopolímeros en combinación con la nanotecnología para vehiculizar los agentes activos facilitando una liberación controlada y dirigida (Chirra & Desai, 2012).

Además en algunas ocasiones las fracciones peptídicas o incluso secuencias peptídicas concretas pueden manifestar más de una actividad biológica, como se ha observado en gelatina de túnica de calamar para actividad antihipertensiva, antioxidante y antitumoral (Alemán *et al.*, 2011b), o en hidrolizados de espinas de bacalao que se obtuvieron propiedades CGRP (péptidos relacionados con el gen de la calcitonina), gastrina/colecistoquinina (CCK) y propiedades antioxidantes (Šližytė *et al.*, 2009). La encapsulación de péptidos activos en liposomas constituye una vía alternativa para mejorar su eficacia y estabilidad en matrices alimentarias (Malheiros *et al.*, 2010). Los liposomas son nanovesículas en forma de bicapa de naturaleza fosfolipídica con capacidad de atrapar en su interior materiales solubles en agua, en lípidos o bien anfifílicos (Mozafari *et al.*, 2008). De especial interés para los compuestos solubles en agua, los liposomas presentan la ventaja adicional de conferirles alta estabilidad cuando son incluidos en alimentos con alta actividad de agua (Desai & Park, 2005).

Siguiendo la misma línea del alimento funcional, también es factible incorporar péptidos bioactivos en películas comestibles destinadas a su consumo directo o bien a formar parte de un alimento, confiriéndole así el carácter de funcional. Péptidos antioxidantes o péptidos antimicrobianos, como la nisina, han sido empleados para la formulación de materiales biopoliméricos de envasado activo, basados en gelatina de origen marino (Giménez *et al.*, 2009) o en caseinato sódico (Cao-Hoang *et al.*, 2010).

Sin embargo, un rasgo diferenciador de las películas biopoliméricas en base a proteínas y/o polisacáridos es su baja resistencia al agua (Guilbert *et al.*, 1996). Además, la incorporación de hidrolizados peptídicos en películas comestibles modifica las propiedades mecánicas de las mismas, ya que induce una excesiva plastificación (Oh *et al.*, 2004; Giménez *et al.*, 2009). Por estos motivos, la encapsulación de péptidos en liposomas tiene un futuro prometedor en el desarrollo de películas comestibles funcionales, no sólo para proteger los péptidos de las interacciones no deseables con la matriz biopolimérica, sino también para mejorar las propiedades físicas de las películas. En este sentido, se ha observado que la incorporación de lípidos emulsionados en películas de caseinato sódico mejora las propiedades de barrera al agua de las mismas y aumenta su resistencia mecánica (Fabra *et al.*, 2009; Khwaldia *et al.*, 2004).

La incorporación de liposomas con péptidos activos en películas está muy poco estudiada. Existe un trabajo previo sobre preparación de una película biodegradable a base de HPMC (hidroxipropil metil celulosa), adicionado de nisina nanoencapsulada en liposomas, como material de envasado antimicrobiano (Imran *et al.*, 2012), sin embargo, no hay información disponible sobre la incorporación de liposomas con péptidos bioactivos en otro tipo de películas comestibles.

### **6.5.3. Objetivos**

Los objetivos del presente estudio fueron: i) obtención de una fracción peptídica (<3 kDa) con actividades biológicas procedente de la hidrólisis enzimática de langostinos enteros, ii) encapsulación de la fracción peptídica obtenida en nanoliposomas de fosfatidilcolina y ii) elaboración de películas comestibles de caseinato sódico conteniendo los nanoliposomas obtenidos. Se caracterizaron las películas obtenidas, y se comprobó la integridad de los nanoliposomas en la película mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

#### 6.5.4. Metodología experimental

Langostinos (*Penaeus notialis*) enteros, sin valor comercial, fueron utilizados como materia prima para la obtención de un hidrolizado peptídico con actividades biológicas.

Las enzimas endógenas de los langostinos fueron inactivadas mediante calentamiento a 80° C durante 20 minutos (Apartado 5.1.4).

Los langostinos fueron triturados y sometidos a hidrólisis enzimática con tripsina a pH 8 y 38° C durante 90 minutos (Apartado 5.3.3).

El hidrolizado obtenido fue sometido a ultrafiltración utilizando una membrana de corte de 3 kDa (Apartado 5.4). En la fracción obtenida se evaluó su actividad antioxidante mediante su capacidad secuestradora de radicales ABTS, su actividad antihipertensiva mediante su actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina-I (ACE), y su actividad hipoglucemiante mediante inhibición de la enzima dipeptidil peptidasa-IV (DPP-IV) (Apartados 5.5.1, 5.5.2 y 5.5.4).

La fracción obtenida fue encapsulada en nanoliposomas de fosfatidilcolina mediante el método de calentamiento. Se prepararon además liposomas sin la fracción peptídica (Apartado 5.7.3).

Se prepararon películas comestibles de caseinato de sodio, sin liposomas, con liposomas vacíos y liposomas encapsulando la fracción peptídica (Apartado 5.7.8) y se caracterizaron las películas con el fin de determinar el grado de interferencia de los liposomas incorporados en las características de la película (Apartado 5.7.8.1).

Tanto los liposomas como las películas en las que se incorporaron los liposomas fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión con el fin de analizar los cambios en la morfología de los liposomas al incorporarlos en las películas (Apartado.5.7.9).

Finalmente, las películas se solubilizaron en agua a 80° C y, mediante filtración en gel, se determinó la proporción de la fracción peptídica que se había liberado (Apartado 5.7.5).

### 6.5.5. Resultados y discusión

Los langostinos enteros fueron hidrolizados alcanzando un grado de hidrólisis de 17.8%. El producto obtenido fue ultrafiltrado a través de una membrana de corte de 3 kDa con el fin de concentrar los péptidos de bajo peso molecular en una fracción peptídica (ST1), e investigar su potencial bioactivo en base a su capacidad antioxidante, inhibidora de la angiotensina-I (ACE) (actividad antihipertensiva) e inhibidora de la dipeptidilpeptidasa-IV, DPP-IV (actividad hipoglucemiante).

#### 6.5.5.1. Composición de aminoácidos de la fracción peptídica

El perfil de aminoácidos de la fracción peptídica ST1 se detalla en la Tabla 18. Los aminoácidos más abundantes presentes en el hidrolizado fueron Gly y Glu, además la fracción presentó niveles relativamente altos de Pro y Ala (5 y 9% respectivamente) y un total de 52 % de aminoácidos hidrofóbicos. A pesar de que la composición de aminoácidos puede variar dependiendo de la especie, edad y tipo de alimentación de los langostinos y gambas, se han descrito relativamente altas cantidades de Gly, Pro y Ala en la composición de aminoácidos de diferentes especies de crustáceos, en concordancia con el perfil de aminoácidos obtenido en la presente fracción (Weber & Van Marrewijk, 1972; Cobb *et al.*, 1974; Mente *et al.*, 2002).

Cabe destacar la contribución minoritaria de residuos de Hyp e Hyl, aminoácidos específicos del colágeno, atribuida a la presencia de tejido conectivo intramuscular (Sivakumar *et al.*, 1999).

**Tabla 18.** Perfil de aminoácidos de ST1

<b>Aminoácido</b>	<b>Número de residuos/1000 residuos</b>
<b>Asp</b>	82
<b>Thr</b>	40
<b>Ser</b>	49
<b>Glu</b>	115
<b>Gly</b>	185
<b>Ala</b>	90
<b>Cys</b>	4
<b>Val</b>	44
<b>Met</b>	22
<b>Ile</b>	35
<b>Leu</b>	69
<b>Tyr</b>	24
<b>Phe</b>	33
<b>Hyl</b>	2
<b>His</b>	17
<b>Lys</b>	75
<b>Arg</b>	60
<b>Hyp</b>	7
<b>Pro</b>	47
<b>Σ Hidrofóbicos*</b>	524

\* Gly, Pro, Ala, Val, Ile, Met, Leu, Phe

#### 6.5.5.2. Actividades biológicas de la fracción peptídica

La actividad antioxidante, determinada mediante su capacidad secuestrante de radicales ABTS, fue de  $69.13 \pm 1.39$  mg VCAC/g, notablemente mayor que la descrita en fracciones semejantes obtenidas a partir de gelatina de túnica de calamar gigante (Alemán *et al.*, 2011). Existen evidencias de hidrolizados procedentes de otras especies de crustáceos con una relativamente alta actividad antioxidante (Guerard *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2009). Esta actividad puede deberse, además del bajo tamaño molecular de los péptidos, a la



presencia significativa de aminoácidos hidrofóbicos, y más específicamente, a la abundancia de Pro, Ala, Val y Leu (Rajapakse *et al.*, 2005; Mendis *et al.*, 2005b). Mendis *et al.* (2005a) indicaron que el equilibrio hidrofílico-hidrofóbico en la secuencia de la gelatina de túnica de calamar también contribuye a la elevada reactividad antioxidante de la gelatina de túnica de calamar. Por otro lado, péptidos que contienen His, Pro o Tyr en sus secuencias se ha observado que actúan como quelantes de metales, quizá por el anillo característico de su molécula (Chen *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001c).

Además, la posible presencia residual de astaxantina procedente de la hidrólisis de los complejos de caroteno-proteínas ha podido contribuir significativamente al incremento de la actividad antioxidante de la fracción peptídica (Manni *et al.*, 2010).

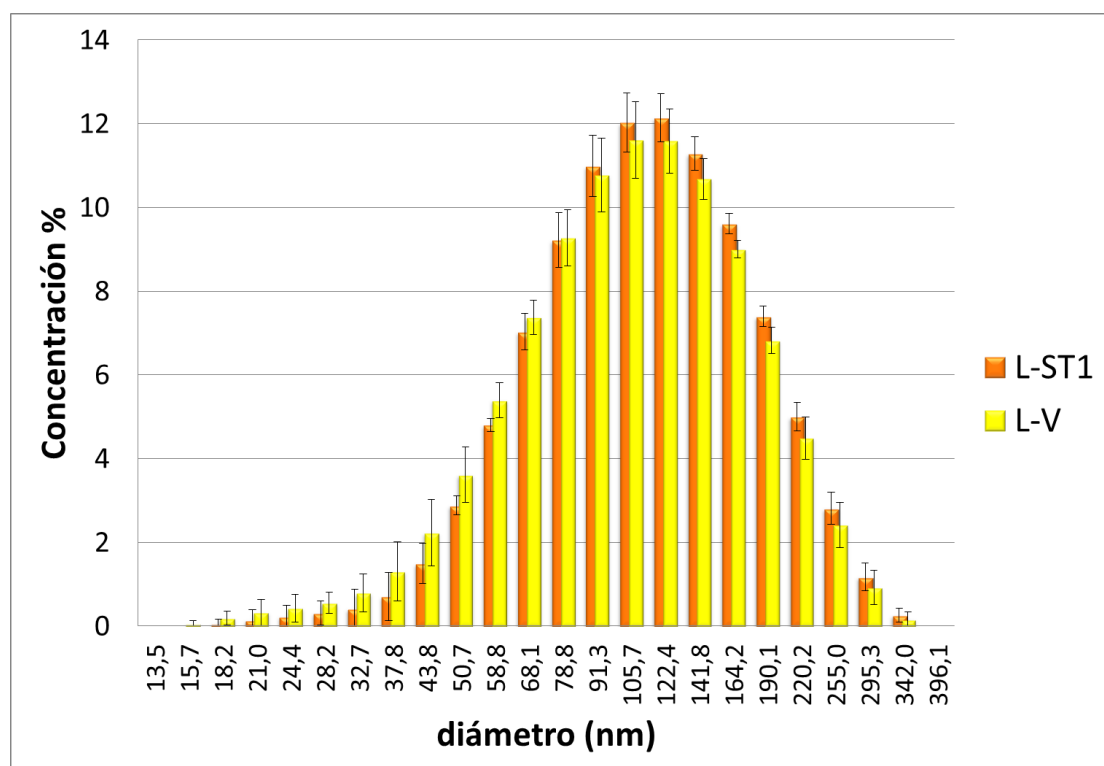
ST1 presentó una actividad inhibidora de la ACE ( $IC_{50}$ ) de  $74 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ . Cheung & Li-Chan (2010) determinaron un  $IC_{50}$  de  $70 \mu\text{g/mL}$  para un hidrolizado de residuos industriales de gamba del Pacífico norte (*Pandalopsis dispar*) hidrolizado con Protamex. He *et al.* (2006) describieron una actividad de  $220 \mu\text{g/mL}$  para la fracción  $<3 \text{ kDa}$  de un hidrolizado de camaroncillo mauxia norteño (*Acetes chinensis*) hidrolizado con una proteasa obtenida de *Bacillus sp.* producida en su propio laboratorio. Estudios diversos apuntan a que la actividad inhibidora de la ACE está favorecida por la presencia de Pro y de aminoácidos hidrofóbicos en la cadena peptídica (Murray & FitzGerald, 2007; Contreras *et al.*, 2009). Como se describió anteriormente, ST1 cumple ambas características.

La actividad inhibidora de la DPP-IV fue de  $0.46 \pm 0.05 \text{ mg/mL}$ . Aunque no se ha estudiado la actividad inhibidora de la DPP-IV en hidrolizados proteicos de crustáceos, dada la actividad encontrada descrita para fracciones peptídicas obtenidas a partir de otras fuentes proteicas como gelatina de salmón del Atlántico ( $IC_{50}$  de la fracción peptídica  $<1 \text{ kDa} = 1.35 \text{ mg/mL}$ ) (Li-Chan *et al.*, 2012a) o gelatina porcina ( $IC_{50}$  de la fracción  $<1 \text{ kDa} = 1.5 \text{ mg/mL}$ ) (Hsu *et al.*, 2013), se podría decir que la actividad encontrada en ST1 es razonablemente

alta. Aunque la actividad inhibidora de la DPP-IV se ha relacionado también con el tamaño de los péptidos (Li-Chan *et al.*, 2012a), la secuencia peptídica es el factor más determinante, ya que la DPP-IV tiene una especificidad de sustratos tipo Xaa-Ala-Yaa o Xaa-Pro-Yaa en el extremo N-terminal de la cadena peptídica (Harada *et al.*, 1982; Yazbeck *et al.*, 2009). Si bien es difícil establecer una relación determinante entre el contenido de Pro y Ala y la actividad inhibidora de la DPP-IV, el relativamente alto contenido de estos aminoácidos en ST1 podría influir positivamente en la elevada actividad encontrada en esta fracción.

#### 6.5.5.3. Nanoencapsulación de la fracción <3 kDa (ST1)

La fracción peptídica ST1 fue encapsulada en nanoliposomas de fosfatidilcolina parcialmente purificada (PC) (L-ST1). A fin de conocer el efecto de ST1 en la conformación y disposición de los liposomas, se realizó un estudio comparativo con liposomas vacíos de PC preparados bajo las mismas condiciones (L-V).



**Figura 27.** Distribución de tamaños de los liposomas. L-ST1: Liposomas encapsulando la fracción <3 KDa de langostinos; L-V: liposomas vacíos

El tamaño de partícula medio de los liposomas, determinado mediante espectroscopía de difracción láser fue de  $99.98 \pm 4$  nm y  $94.4 \pm 2$  nm para L-ST1 y L-V, respectivamente (Figura 27). Se pudo notar un ligero incremento en el tamaño medio de los liposomas al incorporar la fracción peptídica. El mismo efecto fue observado por (Taylor *et al.*, 2007) para liposomas de PC encapsulando nisina, sin embargo no se encontró una relación entre el incremento de la concentración de nisina y el tamaño medio de los liposomas.

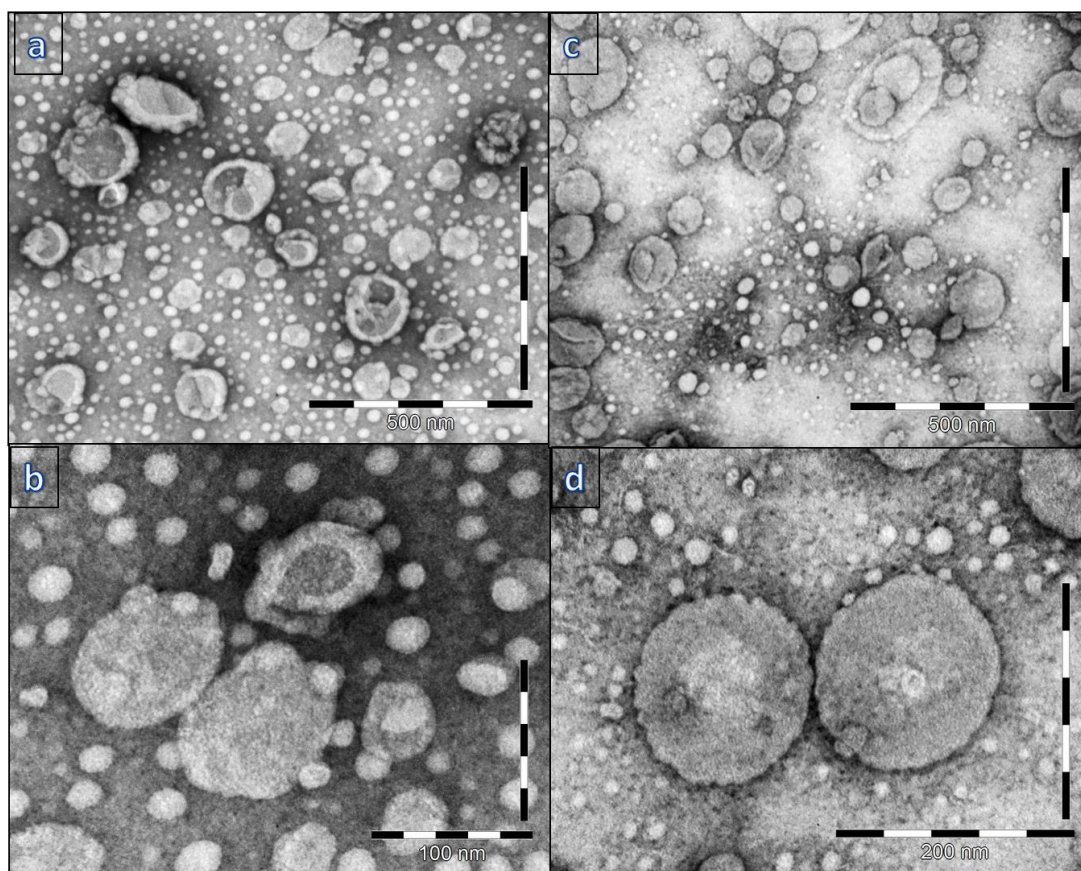
En el presente trabajo, la concentración peptídica y la de fosfatidilcolina se seleccionaron de acuerdo a estudios previos. Los índices de polidispersidad fueron de  $0.186 \pm 0.006$  y  $0.192 \pm 0.007$  para L-ST1 y L-V, respectivamente. El índice de polidispersidad mide el grado de variación de los tamaños de partícula en la dispersión de liposomas. Un índice de alrededor de 0.2 es indicativo de una baja polidispersidad de los liposomas formados (da Silva Malheiros *et al.*, 2011).

El potencial zeta fue de  $-53.86 \pm 2.91$  mV y  $-44.37 \pm 2.85$  mV para L-ST1 y L-V, respectivamente. El potencial zeta mide intensidad de la carga eléctrica de la superficie de los liposomas y es utilizado como índice de estabilidad de una dispersión coloidal (Hans & Lowman, 2002; Taylor *et al.*, 2007). La presencia de ST1 contribuyó a aumentar la estabilidad de los liposomas. La composición de fosfolípidos y sus interacciones con el compuesto encapsulado puede determinar la carga de la superficie de los liposomas (da Silva Malheiros *et al.*, 2011). Por otra parte, (Mozafari, 2005) describió varias ventajas al incorporar glicerol en la fabricación de liposomas, entre las cuales menciona la propiedad de mejorar su estabilidad, ya que sirve de dispersante y previene la coagulación y sedimentación de las vesículas, además mejora la estabilidad de los liposomas en los procesos de congelación y descongelación, permitiendo liofilizarlos sin dañar su estructura. Al comparar el potencial zeta de los liposomas vacíos obtenidos en el presente estudio, se puede ver una gran diferencia con los obtenidos por (Taylor *et al.*, 2008), quienes describieron un potencial zeta de -8 mV para liposomas de PC preparados mediante el método de hidratación de la película. Cabe mencionar que la presencia de otros lípidos

en la composición de la PC puede alterar la estabilidad de los liposomas (da Silva Malheiros *et al.*, 2011). Es por esto que la selección de la materia prima, o una buena purificación de la misma es un paso crucial en la elaboración de este tipo de productos, aunque siempre se denomine parcialmente purificada en uno casos está mucho más purificada que en otros y esto último favorece la mejor encapsulación.

La eficiencia de encapsulación de L-ST1 fue de  $52.37 \pm 2.38\%$ , siendo este un valor intermedio entre las diferentes eficiencias de encapsulación de péptidos descritas en la literatura, donde es posible encontrar valores  $< 20\%$  y  $> 90\%$  (Perrett *et al.*, 1991; Were *et al.*, 2003; Vyas *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2008), (Degnan *et al.*, 1993; Laridi *et al.*, 2003; Colas *et al.*, 2007; da Silva Malheiros *et al.*, 2010). La eficiencia de encapsulación depende principalmente de las interacciones electrostáticas entre los péptidos y el fosfolípido encapsulante (Were *et al.*, 2003).

La fracción peptídica ST1 presenta un contenido equilibrado de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, lo que implica que, aproximadamente la mitad del material peptídico polar podría encontrarse atrapado en el núcleo del liposoma y/o asociado a los grupos polares de las cabezas de PC expuestos al exterior, mientras que el resto apolar se dispondría interaccionando con las colas hidrocarbonadas que conforman la bicapa (Jesorka & Orwar, 2008; Mozafari *et al.*, 2008b).



**Figura 28.** Nanovesículas (a y b: liposomas vacíos (L-V); c y d: liposomas con péptidos (L-ST1))

Las micrografías de la Figura 28 muestran liposomas de morfología globular bien definida y varios tamaños de partícula, dispersos con mayor uniformidad y mayor abundancia de partículas de menor tamaño en el caso de L-V, donde la bicapa formada por las colas hidrofóbicas de la fosfatidilcolina es aparentemente más visible que en L-ST1. Este efecto se atribuye a la interferencia del material peptídico más hidrofóbico en interior de la bicapa lipídica, lo cual puede ser responsable del ligero aumento del tamaño medio de partícula referido anteriormente, así como de su mayor estabilidad. La dispersión de L-ST1 exhibe zonas de aspecto reticulado alrededor de las nanovesículas, que correspondería al material peptídico polar interactuando con las cabezas polares de la fosfatidilcolina posiblemente formando una estructura a modo de membrana típica de fosfatidilcolina-proteína.

#### 6.5.5.4. Incorporación de L-ST1 en películas comestibles

La fracción peptídica encapsulada fue incorporada a películas comestibles fabricadas con caseinato sódico (PL-ST1). En un estudio previo se pudo comprobar que la máxima estabilidad de los liposomas encapsulando una fracción peptídica de similar tamaño molecular fue a pH7. El pH natural de la solución filmogénica de caseinato sódico es muy cercano a 7, no obstante, se tamponó con tampón fosfato 10mM (pH7), para asegurar aún más la estabilidad de los liposomas. Con fines comparativos, se prepararon películas equivalentes con liposomas vacíos (PL-V) y películas de caseinato sin liposomas (P).

La caracterización de las películas se detalla en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Caracterización de las películas: con liposomas con péptidos (P+L+ST1), con liposomas con péptidos vacíos (PL-V) y sin liposomas (P)

	PL-ST1	PL-V	P
<b>Humedad (%)</b>	28.49 ± 1.26 <sup>a</sup>	21.96 ± 1.94 <sup>b</sup>	37.58 ± 1.39 <sup>c</sup>
<b>Espesor (mm)</b>	0.097 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.090 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.097 ± 0.02 <sup>a</sup>
<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1.32 ± 0.013 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.023 <sup>b</sup>	1.07 ± 0.045 <sup>c</sup>
<b>Solubilidad (%)</b>	58.4 ± 2.4 <sup>a</sup>	91.5 ± 1.2 <sup>b</sup>	37.6 ± 1.4 <sup>c</sup>
<b>Transparencia</b>	1.22 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.37 <sup>a</sup>

Las películas con liposomas presentaron un porcentaje más bajo de humedad que las películas sin lípidos, pudiéndose notar una menor pérdida de humedad en las películas con la fracción peptídica ST1. Al elaborar las películas se utilizó el mismo porcentaje de glicerol en la solución filmogénica, y la misma relación caseinato de sodio/glicerol, sin embargo, al calcular el contenido porcentual de los componentes en cada película (Tabla 20) se comprobó que el porcentaje final de glicerol era diferente en cada una de ellas siendo mayor en las películas sin liposomas. Schou *et al.* (2005) describieron una relación lineal, directamente proporcional, entre el contenido de humedad y el contenido de

plastificante en películas elaboradas con caseinato de sodio. En el presente estudio, el contenido de humedad fue menor en las películas con liposomas vacíos en comparación con las que contenían L-ST1, a pesar de que la composición final de glicerol fue mayor en la película con liposomas vacíos. Este efecto puede deberse al componente hidrofílico de la fracción peptídica orientado hacia el exterior de la bicapa lipídica de las nanovesículas, que en contacto con el material polimérico de la película, ejerció un efecto plastificante en la misma. Este efecto ha sido descrito anteriormente en películas comestibles adicionadas de hidrolizados proteicos (Oh, Wang, Field, Aglan, 2004; Giménez *et al.*, 2009).

La incorporación de las nanovesículas aumentó ligeramente la densidad de las películas, especialmente las que incorporaban la fracción peptídica, lo cual está en concordancia con la relación inversa sólidos-humedad en las distintas películas estudiadas, sin embargo, en ningún caso se modificó significativamente ( $p > 0.05$ ) el espesor de las mismas. Tampoco se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el nivel de transparencia de las películas, lo cual es atribuido al pequeño tamaño de los liposomas adicionados. La incorporación de lípidos emulsionados en películas de caseinato sódico ha sido descrito que produce una disminución acusada de la transparencia, con tamaños medios de partícula en un rango comprendido entre 0.8 y 2.5  $\mu\text{m}$  (Fabra, Talens & Chiralt, 2009).

**Tabla 20.** Composición porcentual de las películas\*

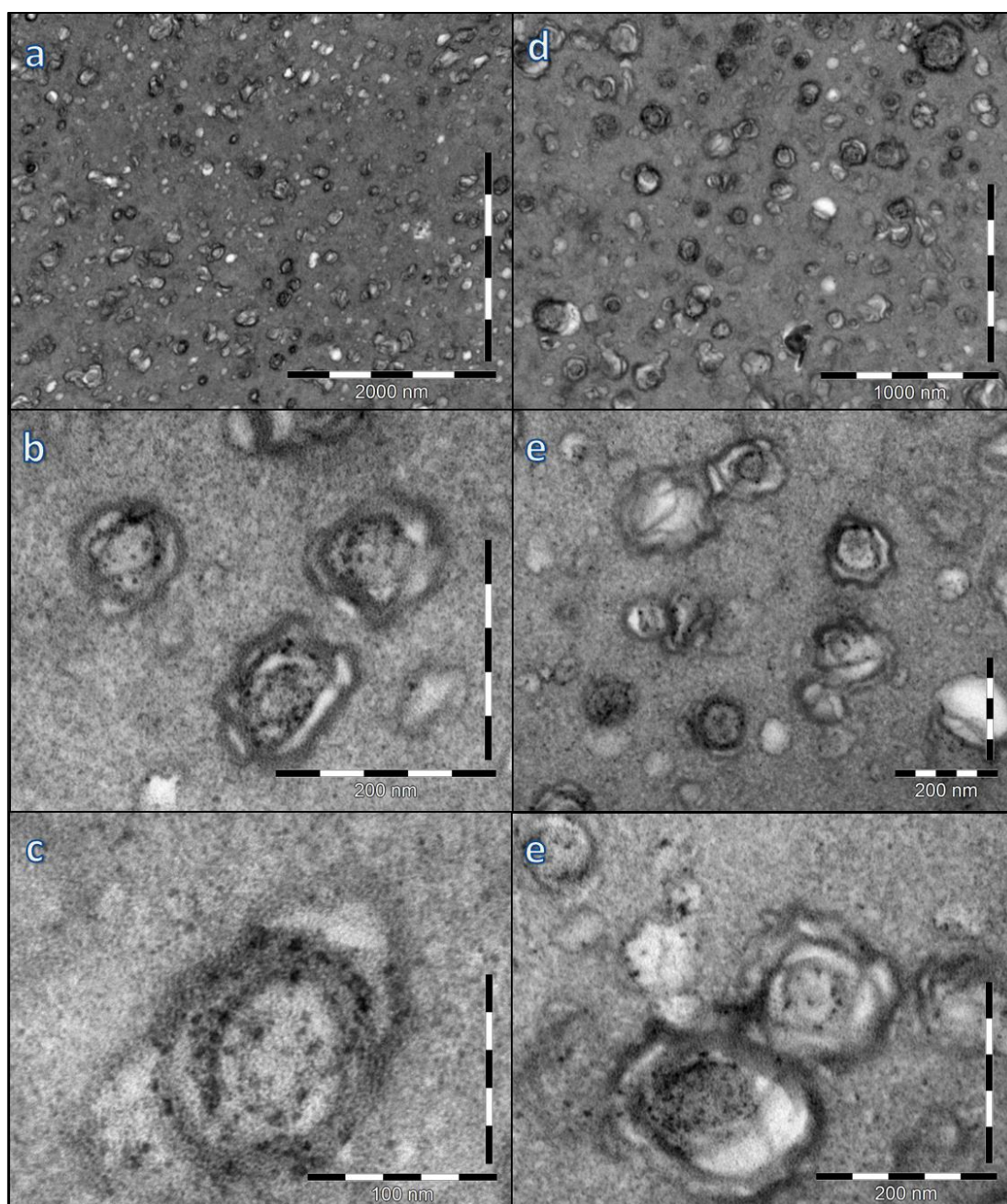
	<b>PL-ST1</b>	<b>PL-V</b>	<b>P</b>
<b>PC (%)</b>	15.00	16.72	0.00
<b>ST1 (%)</b>	1.53	0.00	0.00
<b>Glicerol (%)</b>	15.00	16.72	17.02
<b>Caseinato (%)</b>	39.99	44.59	45.40
<b>Agua (%)</b>	28.49	21.96	37.58

\*Datos estimados, basados en los ingredientes y la composición de humedad

Las dos películas con liposomas fueron notablemente más solubles en agua que la película sin las nanovesículas, a pesar de la presencia del material hidrofóbico de la fosfatidilcolina, el cual, no obstante, está orientado hacia el interior vesicular. El aumento de solubilidad se atribuye por tanto, a la discontinuidad que producen los liposomas en la matriz del caseinato altamente agregada. Asimismo, se observó una mayor solubilidad en la película con liposomas sin péptidos (PL-V), lo cual puede ser debido a que los péptidos que se encuentran fuera de las nanocápsulas interactúan con la matriz proteica de la película, disminuyendo la mencionada discontinuidad. Es importante tener en cuenta que estas películas están diseñadas para ser ingeridas y que el compuesto bioactivo incorporado en las mismas llegue al organismo. En este caso, una mayor solubilidad en agua es una característica deseable. Según Souza *et al.* (2009), la solubilidad deseada en una película comestible depende de la función que se le quiera dar, así, películas menos solubles podrían utilizarse para proteger productos con alta actividad de agua, sin embargo películas altamente solubles en agua podrían servir incluso como dispositivos de transporte y absorción de compuestos bioactivos a nivel de la cavidad oral (Heinemann *et al.*, 2013).

Con el fin de comprobar la integridad de los liposomas en la película, éstas se analizaron en un microscopio electrónico (Figura 29).





**Figura 29.** Fotografías MET de películas de caseinato sódico con liposomas. Foto del corte transversal de películas con: a,b,c liposomas vacíos (L-V); c,d,e liposomas con ST1.

Las películas con liposomas presentaron una distribución uniforme y bien integrada de los mismos en su estructura (Figura 29 a y d). En relación a la morfología de los liposomas, se observa en general una tendencia a perder la forma esférica, obteniéndose estructuras más ovaladas y de perímetro más

irregular, pero conservando su integridad estructural y el tamaño original. A diferencia de lo observado anteriormente en las dispersiones de liposomas, cuando estos están inmersos en la matriz polimérica, la doble capa lipídica es evidente tanto en los liposomas vacíos como en los que contienen la fracción lipídica, lo cual puede ser debido a interacciones adicionales de los péptidos con la matriz polimérica que pueden verse incrementadas durante el proceso de secado.

#### 6.5.5.5. Liberación de los péptidos

Las películas fueron solubilizadas en agua y sometidas a calentamiento y agitación con el fin de disolverlas. Utilizando el mismo protocolo que el utilizado para determinar la eficiencia de encapsulación, se separó el péptido libre mediante filtración en gel. A través de este proceso se pudo determinar que tras la solubilización de la película en agua, se liberó un  $48.2 \pm 3.2\%$  de ST1, información, que junto a la interpretada tras analizar las imágenes de la microscopía electrónica señalan a la incorporación de nanoliposomas conteniendo fracciones peptídicas bioactivas en películas comestibles de caseína, como un buen método la fabricación de un alimento funcional, protegiendo a su vez a ST1 en una doble estructura, lo que posiblemente ayude a incrementar la eficacia de las bioactividades de esta fracción peptídica, al ingresar en el organismo.

Con el fin de evaluar el potencial efecto antihipertensivo de la película de caseinato sódico con L-ST1, se calculó el  $IC_{50}$  tomando en cuenta el porcentaje de ST1 en la película y tomando en cuenta que el  $IC_{50}$  del Enalapril© es  $2.7 \mu\text{g/mL}$  (Alemán *et al.*, 2011c) y que esta droga es comercializada en presentaciones de 2.5, 5, 10 y 20 mg, se necesitaría una dosis de 9 g de película con L-ST1 para emular una dosis de 5 mg de Enalapril©, además, esta misma cantidad de película aportaría un 3% de la actividad hipoglucemiante que proporciona la droga sintética Linagliptina ( $IC_{50} = 1\text{nM}$ ), comercializada en dosis de 5 mg. Cabe destacar que el grosor de la película puede fabricarse dependiendo de la aplicación que se le quiera dar, y dependiendo de ese

grosor la película contendrá una mayor cantidad de L-ST1. Por ejemplo, si se fabrica un producto tipo pasta (con la misma fórmula de las películas), alta en proteína, sería apta para una persona diabética, siendo no solo un alimento con un bajo contenido de carbohidratos, sino que una porción de 100 g aportaría un 31% de la actividad de la Lignagliptina.

#### **6.5.6. Conclusiones**

Los resultados del presente estudio indican que se pueden incorporar nanoliposomas de fosfatidilcolina en películas comestibles elaboradas con caseinato sódico. Una fracción peptídica de bajo peso molecular procedente de un hidrolizado de langostinos con altas actividades antioxidante, inhibidora de la ACE e inhibidora de la DPP-IV fue exitosamente encapsulada en nanoliposomas de fosfatidilcolina. Estos liposomas presentaron excelentes índices de estabilidad y tamaño, junto a una buena eficiencia de encapsulación al compararlos con trabajos realizados con materiales similares. Los liposomas mantuvieron su integridad en la película protegiendo a la fracción peptídica en una doble estructura.

### 6.5.7. Bibliografía

Aasen, I. M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L. & Naterstad, K., (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1-2), 35-43.

Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 334-341.

Cao, W., Zhang, C., Hong, P., & Ji, H. (2009). Optimising the free radical scavenging activity of shrimp protein hydrolysate produced with alcalase using response surface methodology. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(8), 1602-1608.

Cao-Hoang, L., Chaine, A., Grégoire, L., & Waché, Y. (2010). Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiology*, 27(7), 940-944.

Chen, H. -, Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49-53.

Cheung, I. W. Y., & Li-Chan, E. C. Y. (2010). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts investigated by Taguchi design. *Food Chemistry*, 122(4), 1003-1012.

Chirra, H. D., & Desai, T. A. (2012). Emerging microtechnologies for the development of oral drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(14), 1569-1578.

Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., & Degraeve, P. (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, 19(10), 982-989.

Cobb, B. F., Vanderzant, C., & Hyder, K. (1974). Effect of ice storage on the free amino acid contents of tails of white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(6), 1052-1055.

Colas, J. -, Shi, W., Rao, V. S. N. M., Omri, A., Mozafari, M. R., & Singh, H. (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38(8), 841-847.

- Contreras, M. d. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566-573.
- Cudennec, B., Ravallec-Plé, R., Courois, E., & Fouchereau-Peron, M. (2008). Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry*, 111(4), 970-975.
- da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., da Silveira, N. P. & Brandelli, A., (2010a). Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*, 27(1), 175-178.
- da Silva Malheiros, P., Micheletto, Y. M. S., Silveira, N. P. d. & Brandelli, A., (2010b). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43(4), 1198-1203.
- da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Micheletto, Y. M. S., Da Silveira, N. P. & Brandelli, A., (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: Physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3545-3552.
- Degnan, A. J., Buyong, N., & Luchansky, J. B. (1993). Antilisterial activity of pediocin ACh in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *International journal of food microbiology*, 18(2), 127-138.
- Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.
- Fabra, M., Jiménez, A., Atarés, L., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10(6), 1500-1507.
- Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36(8–9), 809-812.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009a). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976-983.
- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, M. P. (2009b). Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 585-592.
- Guerard, F., Sumaya-Martinez, M. T., Laroque, D., Chabeaud, A., & Dufossé, L. (2007). Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42(11), 1486-1491.

Guilbert, S., Gontard, N., & Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings. *LWT - Food Science and Technology*, 29(1–2), 10-17.

Hans, M. L., & Lowman, A. M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 319-327.

Harada, M., Fukasawa, K. M., Fukasawa, K., & Nagatsu, T. (1982). Inhibitory action of proline-containing peptides on Xaa-Pro-dipeptidylaminopeptidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 705(2), 288-290.

He, H. -, Chen, X. -, Sun, C. -, Zhang, Y. -, & Zhou, B. -. (2006). Analysis of novel angiotensin-i-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *Journal of Peptide Science*, 12(11), 726-733.

Heinemann, R. J. B., Carvalho, R. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Orally disintegrating film (ODF) for delivery of probiotics in the oral cavity — Development of a novel product for oral health. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19(0), 227-232.

Hsu, K., Tung, Y., Huang, S., & Jao, C. (2013). Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity of Peptides in Porcine Skin Gelatin Hydrolysates. *BIOACTIVE FOOD PEPTIDES IN HEALTH AND DISEASE*, , 205.

Imran, M., Revol-Junelles, A. -, René, N., Jamshidian, M., Akhtar, M. J., Arab-Tehrany, E., Jacquot, M., & Desobry, S. (2012). Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 407-419.

Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu.Rev.Anal.Chem.*, 1, 801-832.

Khwaldia, K., Banon, S., Desobry, S., & Hardy, J. (2004). Mechanical and barrier properties of sodium caseinate–anhydrous milk fat edible films. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(4), 403-411.

Kim, S. -, Kim, Y. -, Byun, H. -, Park, P. -, & Ito, H. (2001). Purification and Characterization of Antioxidative Peptides from Bovine Skin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 34(3), 219-224.

Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. -, Vuilleumard, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13(4), 325-336.

- Li-Chan, E. C. Y., Hunag, S. -, Jao, C. -, Ho, K. -, & Hsu, K. -. (2012). Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973-978.
- Maes, M., Scharpé, S., & De Meester, I. (2007). Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. *Clinica Chimica Acta*, 380(1–2), 31-49.
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., & Nasri, M. (2010). Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 345-357.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. -, & Kim, S. -. (2005a). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. -. (2005b). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 581-587.
- Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D., Davidson, I., & Sorgeloos, P. (2002). Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *Journal of Experimental Biology*, 205(20), 3107-3122.
- Mishra, D., Mishra, P. K., Dubey, V., Nahar, M., Dabadghao, S., & Jain, N. K. (2008). Systemic and mucosal immune response induced by transcutaneous immunization using Hepatitis B surface antigen-loaded modified liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(4–5), 424-433.
- Mochida, T., Hira, T., & Hara, H. (2010). The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. *Endocrinology*, 151(7), 3095-3104.
- Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: An overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(4), 711-719.
- Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008a). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18(4), 309-327.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008b). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 833-844.
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current pharmaceutical design*, 13(8), 773-791.



- Oh, J., Wang, B., Field, P. D., & Aglan, H. A. (2004). Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(3), 287-294.
- Perrett, S., Golding, M., & Williams, W. P. (1991). A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: Characterization of the liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43(3), 154-161.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. -, & Kim, S. -. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569.
- Schou, M., Longares, A., Montesinos-Herrero, C., Monahan, F. J., O'Riordan, D., & O'Sullivan, M. (2005). Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *LWT - Food Science and Technology*, 38(6), 605-610.
- Šližytė, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M., & Rustad, T. (2009). Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, 44(6), 668-677.
- Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Casariego, A., Lima, A. M. P., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2009). Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2110-2115.
- Taylor, T. M., Bruce, B. D., Weiss, J., & Davidson, P. M. (2008). *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition in vitro by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. *Journal of Food Safety*, 28(2), 183-197.
- Taylor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by  $\zeta$ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2(1), 1-9.
- Vyas, S. P. *et al.* (2005). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. *International journal of pharmaceutics*, 296(1–2), 80-86.
- Weber, R. E., & Van Marrewijk, W. J. A. (1972). Free amino acids in the shrimp crangon crangon and their osmoregulatory significance. *Netherlands Journal of Sea Research*, 5(4), 391-415.
- Were, L. M., Bruce, B. D., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2003). Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8073-8079.

Yazbeck, R., Howarth, G. S., & Abbott, C. A. (2009). Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends in pharmacological sciences*, 30(11), 600-607.

Zhang, C., Li, X., & Kim, S. (2012). Application of marine biomaterials for nutraceuticals and functional foods. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 625-631.



## **DISCUSIÓN GENERAL**



### 7.1. Obtención de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas a partir de subproductos de la pesca

Para la obtención de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas se utilizaron cuatro residuos de la industria pesquera, todos ellos ricos en material proteico: espinas de dorada (Capítulo 6.1), túnica de calamar gigante (Capítulo 6.2), escamas de dorada (Capítulos 6.1 y 6.3) y langostinos enteros sin valor comercial (capítulo 6.5) (Figura 30).



**Figura 30.** Materias primas utilizadas en el presente estudio. a) escamas de dorada; b) espina de dorada; c) túnica de calamar gigante; d) langostinos.

#### 7.1.1. Acondicionamiento de las materias primas

Todas las materias primas se recibieron congeladas, es por esto que para su uso se descongelaron y lavaron previamente.

Los langostinos enteros crudos (*P. notialis* sp) fueron sometidos a tratamiento térmico (80 °C durante 20 minutos), con el fin de inactivar las enzimas

endógenas, y a continuación, se trituraron. Se trata de langostinos congelados que han excedido el periodo útil de almacenamiento y que representan un excedente no comercializable. Al hidrolizar el producto entero (cefalotórax y cuerpo muscular), el conjunto de péptidos obtenidos presentará una composición muy compleja y variada.

Por el contrario, tanto las espinas y escamas de dorada (*S. aurata*), como la túnica de calamar gigante (*D. gigas*), son materiales ricos en colágeno, cuya secuencia aminoacídica es mucho más uniforme al ser una sola proteína. Si bien en la túnica se encuentra de forma más pura, mientras que en las espinas y en escamas está asociado a gran cantidad de minerales. En la mayoría de los trabajos publicados sobre la obtención de hidrolizados peptídicos a partir de subproductos de origen pesquero ricos en colágeno, como primer paso se extrae gelatina (colágeno desnaturalizado) para facilitar la hidrólisis enzimática posterior.

Estudios previos en nuestro grupo de investigación analizaron hidrolizados y fracciones peptídicas procedentes de gelatina de calamar gigante (Giménez *et al.*, 2009a; Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Alemán *et al.*, 2011b; Alemán *et al.*, 2011c), por lo que el estudio de esta gelatina no es objeto de la presente Memoria. En el presente trabajo se procedió a hidrolizar directamente la túnica del calamar, omitiendo el paso previo de extracción de gelatina ya estudiado, para determinar así el proceso más conveniente para la obtención de hidrolizados peptídicos a partir de esta materia prima.

El manto de calamar está compuesto por tejido muscular y tejido conectivo (túnica de calamar interna y externa) que envuelve el paquete muscular. En el proceso de transformación industrial del calamar gigante, las túnicas se separan mecánicamente del manto entero. Sin embargo, una parte considerable de músculo, cerca del 50%, persiste adherido a la túnica, por lo que para el aprovechamiento de este subproducto como fuente de colágeno, es necesario retirar los restos de la proteína muscular. Para facilitar el proceso, éste se llevó a cabo mediante una máquina deshuesadora industrial (Baader).

A continuación, las tónicas libres de músculo fueron lavadas y secadas en estufa. Tras este proceso se obtuvo un rendimiento del 6.13% en relación al peso inicial. El tejido conectivo está compuesto principalmente por colágeno, sin embargo el contenido de tejido conectivo en el manto de calamar se ha descrito como muy variable, ya que los cefalópodos son especies de rápido crecimiento, lo que implica un alto grado de recambio proteico (Sikorski & Borderias, 1995; Torres-Arreola *et al.*, 2008).

Tanto la túnica como el músculo recuperado se pueden aprovechar para la obtención de diversos productos. En el presente estudio se utilizó únicamente la túnica de calamar deshidratada como materia prima de partida para la obtención de los hidrolizados procedentes de material colagenoso. El método de deshidratación, por desecación en estufa o por liofilización, constituyó una primera variable del estudio, con objeto de elucidar su efecto en la eficiencia del proceso de hidrólisis. En estudios preliminares se realizó la hidrólisis con muestras húmedas, pero se decidió descartar este caso para fines comparativos, ya que con material desecado se puede estandarizar mejor.

En el caso de las escamas de dorada, también se realizó un estudio comparativo analizando los hidrolizados obtenidos a partir de gelatina de escamas y a partir de escamas desmineralizadas, con el fin de determinar el mejor tratamiento para la obtención de hidrolizados con actividades biológicas. Tanto para la extracción de gelatina, como para la hidrólisis directa de las escamas, fue necesario proceder a una desmineralización previa. Se estudiaron las escamas y espinas de dorada (*Sparus aurata*) como fuente de gelatina.

#### 7.1.1.1. Desmineralización de escamas de dorada

Las escamas lavadas y secadas presentaron un contenido de cenizas de 59.8%. Tras el proceso de desmineralización con EDTA éstas presentaron un contenido de cenizas de 0.116% y un contenido de proteína de 90.4%, consiguiéndose un rendimiento del 43.7% con respecto a la materia prima, lo



que demuestra la efectividad de este método de desmineralización en escamas de dorada. Para más detalle ver el apartado 6.3.5.1.

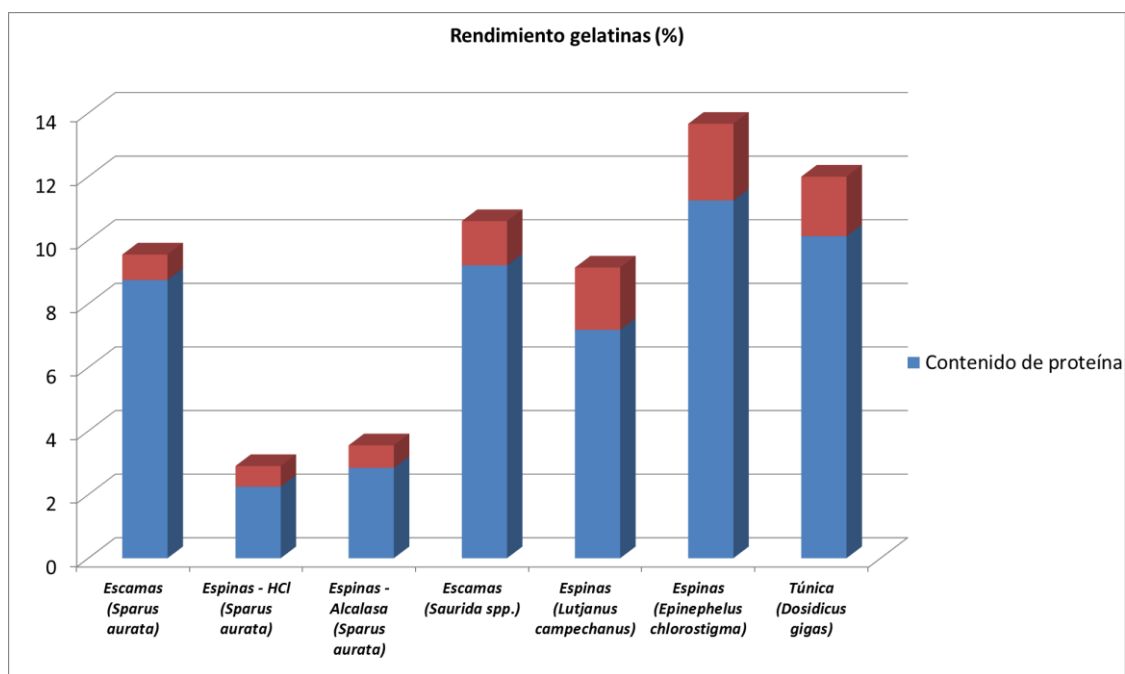
#### 7.1.1.2. *Extracción de gelatina de escamas y espinas de dorada*

La gelatina es un biopolímero ampliamente utilizado en la industria. Su calidad depende tanto de la fuente como del proceso de extracción, ya que ambos condicionan la composición aminoacídica y el peso molecular promedio de las cadenas polipeptídicas. Para evaluar la calidad de la gelatina extraída se tomó en cuenta el rendimiento, la fuerza del gel, así como las propiedades viscoelásticas al disolver la gelatina en agua a una concentración del 6.67% (w/v). Esta es la concentración estándar utilizada para determinar el valor “Bloom” o fuerza de gel a nivel comercial.

En trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio se estudiaron las propiedades tanto de la gelatina extraída de la túnica de calamar gigante, como de sus hidrolizados (Giménez *et al.*, 2009b; Alemán *et al.*, 2011c), en los cuales el rendimiento obtenido en la extracción de esta gelatina de calamar fue del 12% (Figura 31). Se han descrito rendimientos entre 4 y 16% para gelatinas procedentes de pieles de pescado (Jeya Shakila *et al.*, 2012). Con respecto a la gelatina extraída a partir de espinas y escamas de dorada, el mayor rendimiento se obtuvo de la extracción a partir de escamas (9.55%), siendo este resultado similar al descrito por Wangtueai & Noomhorm (2009a) (Para más detalle ver el apartado 6.1).

De las espinas se obtuvieron rendimientos muy bajos y además las propiedades de la gelatina no fueron destacables, tanto en las espinas pre-tratadas con HCl como con Alcalasa. Adicionalmente, el pre-tratamiento de las espinas con HCl dio lugar a un incremento en la desmineralización. La fuerza del gel de la gelatina de espinas es baja, no obstante dio un verdadero gel. La estabilidad térmica del gel de gelatina de espinas mostró una temperatura de fusión de 22-23° C, encontrándose solo pequeñas diferencias entre las gelatinas extraídas de las espinas pretratadas con HCl o Alcalasa. Como se ha mencionado anteriormente los rendimientos de gelatina a partir de espina de

dorada fueron bajos, por ese motivo se descartó elaborar hidrolizados a partir de ello, y se prefirió profundizar los estudios de desarrollo de hidrolizados utilizando escamas como materia prima.



**Figura 31.** Rendimiento de diferentes extracciones de gelatina

La fuerza del gel fue muy diferente entre las distintas gelatinas obtenidas. La gelatina de escamas presentó una fuerza de gel de  $126 \pm 1$  g, siendo este resultado similar al obtenido por Giménez *et al.* (2009b) en gelatina de túnica de calamar ( $147 \pm 27$  g). Por el contrario, las gelatinas de espinas de dorada presentaron valores de fuerza de gel inferiores a 90 g. Al analizar en las mismas condiciones experimentales una gelatina comercial de alta calidad procedente de piel bovina (Bloom 200-220) se obtuvo una fuerza de gel de  $105 \pm 5$  g, lo que indica que tanto la gelatina de escamas como la de túnica de calamar son gelatinas de alta calidad. De la misma forma, tanto la gelatina de escamas como la de túnica de calamar presentaron mejores propiedades viscoelásticas en comparación a las gelatinas obtenidas a partir de espinas de dorada (Figuras 13 y 14; apartado 6.1.5.1.5).

Dada la eficiente desmineralización y del alto rendimiento alcanzado en la gelatina de escamas de dorada, ésta se escogió como materia prima para el estudio de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas.

### **7.1.2. Hidrólisis enzimática**

Como se mencionó anteriormente, en la obtención de hidrolizados peptídicos con actividades biológicas a partir de fuentes ricas en colágeno, es usual obtener previamente gelatina para facilitar la hidrólisis enzimática posterior. Sin embargo, la gelatina de pescado es en sí mismo un producto de alto valor comercial, y en especial, la gelatina de escamas ha demostrado que puede presentar propiedades comparables a las gelatinas comerciales de mamíferos. Por este motivo, la hidrólisis directa de las escamas desmineralizadas se plantea como una alternativa económicamente más rentable que la hidrólisis de la gelatina. Para rentabilizar más el proceso se podría una vez obtenida la gelatina, de los residuos de la extracción obtener los hidrolizados. Con fines comparativos, en este trabajo se hidrolizó tanto la gelatina como las escamas desmineralizadas (colágeno parcialmente purificado), y se analizaron las actividades biológicas resultantes, así como los rendimientos, con objeto de determinar el tratamiento más eficiente.

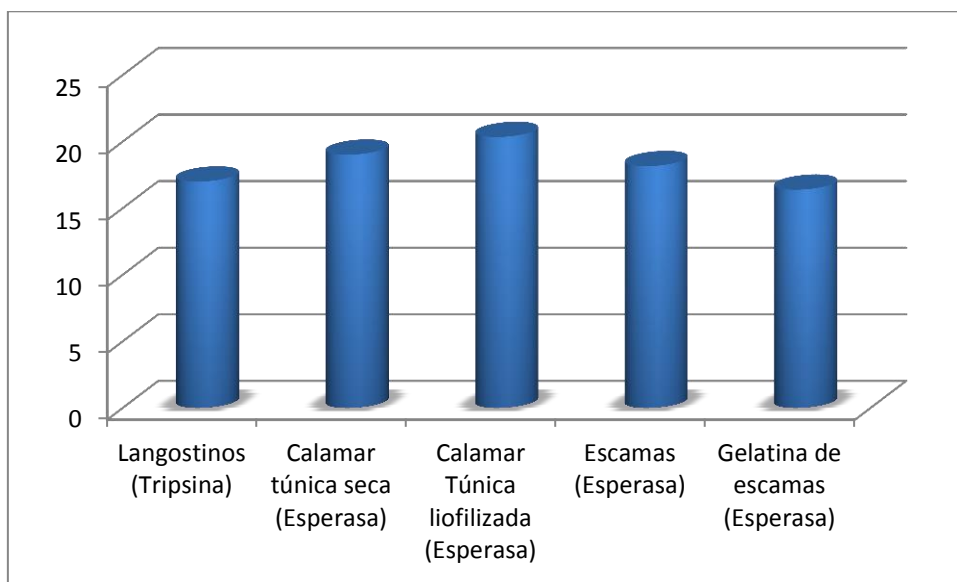
En el caso de los langostinos, la industria dedicada al procesamiento de los mismos genera diferentes tipos de desechos tales como aguas de cocción, caparazones, cabezas, e incluso langostinos enteros que no supera los controles de calidad por razones diversas (melanosis, abuso de temperatura, caducidad, rotura, etc...). Para este estudio se hidrolizaron langostinos enteros crudos y se compararon las actividades de los hidrolizados obtenidos con las de los hidrolizados derivados del colágeno (de túnicas de calamar gigante y de escamas de dorada).

#### **7.1.2.1. Grado de hidrólisis**

Para el control de las hidrólisis proteicas es necesaria la evaluación del grado de hidrólisis (DH). Los mayores grados de hidrólisis se obtuvieron en los

hidrolizados de túnica de calamar, especialmente en la desecada por liofilización. En estudios preliminares se observó que el grado de hidrólisis de la túnica de calamar liofilizada fue semejante al obtenido para túnicas no desecadas. Por el contrario, el menor grado de hidrólisis se determinó en el hidrolizado de gelatina de escamas de dorada, que fue aproximadamente 2% menor que el determinado en el hidrolizado de escamas desmineralizadas. La extracción previa de gelatina de escamas, por lo tanto, no favorece un mayor grado de hidrólisis, debido a que se trata de un colágeno parcialmente hidrolizado.

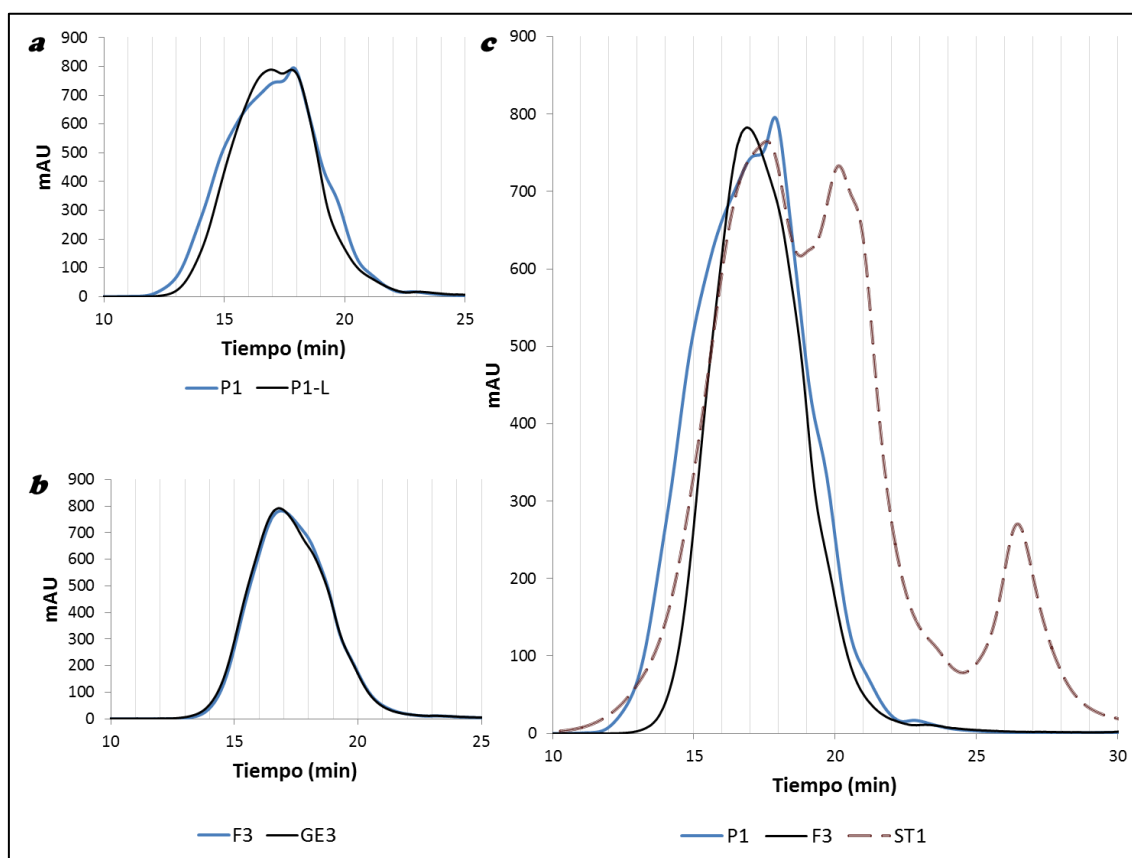
Por otro lado, el grado de hidrólisis alcanzado en el hidrolizado de langostinos es comparable al del material colagenoso. Dado que se trata de un material muy diferente y con proteína muy diversa se ha utilizado otra enzima (tripsina, en lugar de Esperasa). En general, la selección de las enzimas empleadas en la presente Memoria, así como las condiciones de hidrólisis (tiempo-temperatura) se basan en estudios previos realizados en nuestro laboratorio.



**Figura 32.** Grados de hidrólisis (DH) (%)

### 7.1.3. Fraccionamiento

Se obtuvieron fracciones peptídicas de distinto peso molecular ( $< 10$  kDa,  $< 3$  kDa y  $< 1$  kDa) a partir de las diversas materias primas mediante ultrafiltración, con el objeto de concentrar los péptidos más activos en las fracciones de menor tamaño molecular. Para determinar diferencias en la distribución de pesos moleculares de las fracciones peptídicas más pequeñas ( $< 7$  kDa), se realizó un análisis de tamaños moleculares mediante SEC-HPLC (rango de fraccionamiento entre 7000 y 200 Da) (Figura 33).



**Figura 33.** Cromatogramas por tamaño de exclusión molecular de las fracciones peptídicas. a) P1 y P1-L b) F3 y GE3 y c) P1, F3, ST1 P1: fracción hidrolizada  $< 1$  kDa de túnica de calamar desecada, P1L: fracción hidrolizada  $< 1$  kDa túnica de calamar liofilizada, F3: fracción hidrolizada  $< 3$  kDa de escamas desmineralizada de dorada, GE3: fracción hidrolizada  $< 3$  kDa de gelatina de escamas de dorada, ST1: fracción de hidrolizada  $< 1$  kDa de langostino

Para comprobar la eficiencia del proceso de fraccionamiento por ultrafiltración, se compararon las fracciones <1 kDa obtenidas a partir de **túnica de calamar** (desechada en estufa y liofilizada) con los correspondientes hidrolizados sin fraccionar (Figura 16; apartado 6.2.4.1), y se pudieron observar ligeras diferencias. En el caso de los hidrolizados sin fraccionar, los primeros tiempos de retención difirieron ligeramente entre 1560 y 1280 Da para los hidrolizados de túnica desechada y túnica liofilizada, respectivamente (E-D y E-L). El hidrolizado procedente de la túnica liofilizada presentó un segundo pico adicional de retención a 600 Da, que sugiere una mayor proteólisis. Por su parte, al analizar las fracciones peptídicas < 1 kDa, también se registraron inicialmente dos picos, que en este caso aparecieron aproximadamente con los mismos tiempos de retención en las 2 fracciones (P1 y P1-L; Figura 33a), correspondiendo el primero a 1010 Da y el segundo a 680 Da. Esto demuestra la eficacia de la ultrafiltración para separar grupos peptídicos de bajo peso molecular.

Las dos fracciones peptídicas < 3kDa procedentes de **escamas de dorada** (Gelatina; GE3 y Escamas desmineralizadas; F3), presentaron gran similitud entre sí (Figura 33b). Los principales tiempos de retención correspondieron a péptidos de 1040 y 1090, Da respectivamente, para escamas desmineralizadas y gelatina de escamas. Estos valores son parecidos a los que presentaron las fracciones de túnica de calamar y revelan el predominio de péptidos de peso molecular en torno a 1 kDa

El coctel enzimático Esperasa (serin proteasa; EC 3.4.21.14), al igual que la Alcalasa (EC 3.4.21.62) es un preparado comercial con una conocida alta acción catalítica (Hjortkjaer *et al.*, 1993). En el caso de la hidrólisis de **langostinos**, se empleó tripsina como enzima alternativa, de amplio uso alimentario. La fracción <3 kDa obtenida de langostinos hidrolizados con tripsina, presentó un perfil muy diferente al resto de fracciones con 2 tiempos de retención bien diferenciados dentro del rango de detección de la columna utilizada, correspondientes a 750 Da y 220 Da (Figura 33c). La tripsina es una enzima proteolítica (EC 3.4.21.4) que cataliza el corte de los enlaces peptídicos

en el extremo C-terminal de los aminoácidos Lys y Arg (Jaturanpinyo *et al.*, 2004; Matthew *et al.*, 2008). En el presente estudio, el hidrolizado de langostinos con tripsina alcanzó un grado de hidrólisis comparable al determinado para los hidrolizados con Esperasa y también con Alcalasa (Figura 32), lo que junto al perfil de tamaños moleculares, demuestra la eficiencia de la hidrólisis de langostinos con esta enzima para la obtención de péptidos de peso molecular inferior a 1 kDa.

En la presente Memoria nos hemos centrado en la búsqueda de fracciones con actividades bioactivas concretas, por ello, los hidrolizados completos se descartan para el presente trabajo, pero a escala industrial se podrían utilizar como ingrediente alimentario con propiedades funcionales tecnológicas diversas (Giménez *et al.*, 2009a).

#### **7.1.4. Composición de aminoácidos de las fracciones peptídicas**

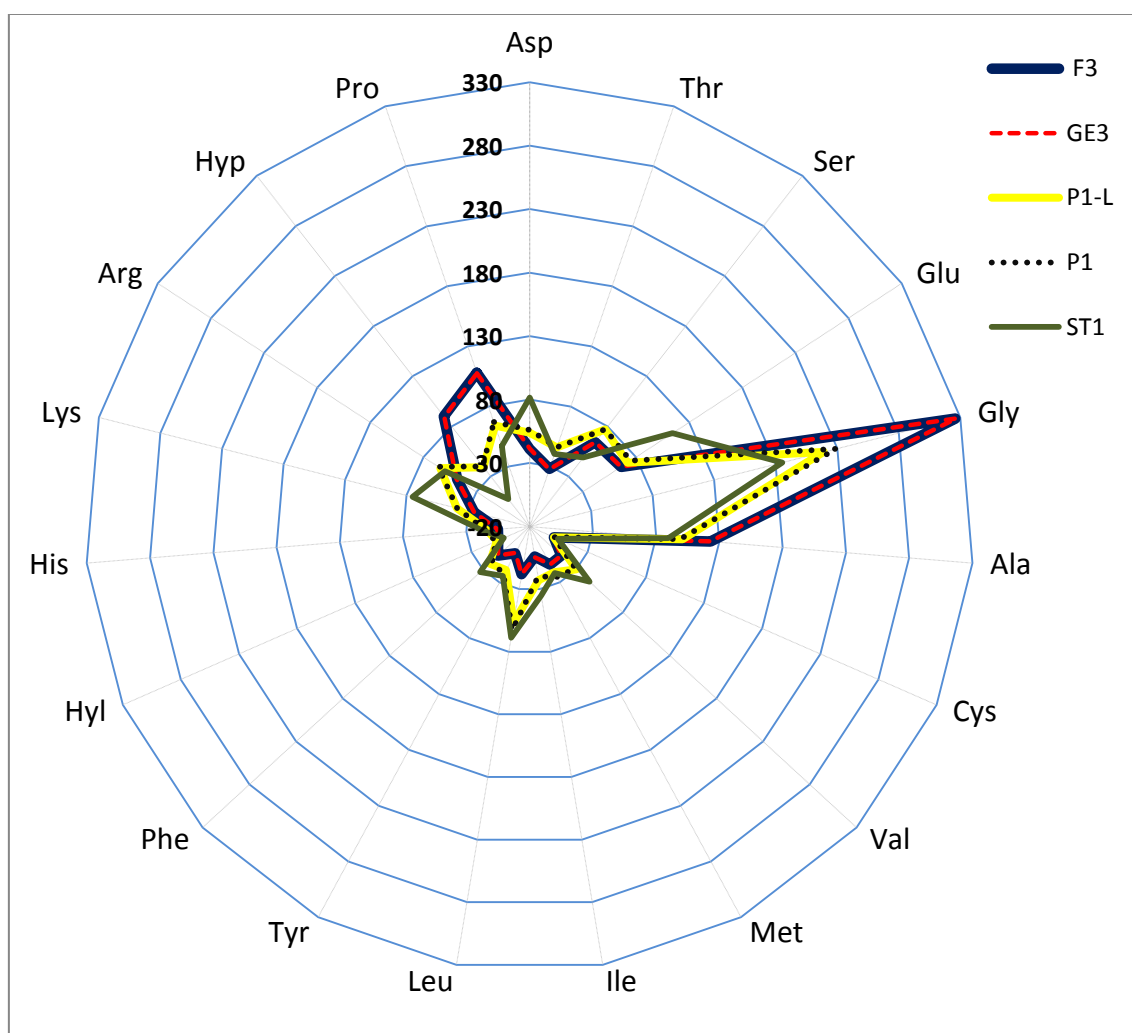
Todas las fracciones peptídicas fueron sometidas a un análisis de aminoácidos con el fin de determinar el posible efecto del perfil de aminoácidos en las diferentes actividades. Las fracciones obtenidas a partir de **residuos colagenosos** presentaron perfiles similares entre sí (Tabla 21), siendo en todos los casos la Gly el aminoácido más abundante.

El contenido de aminoácidos hidrofóbicos fue similar en todas las fracciones (> 50%), pudiéndose notar una leve concentración de los mismos en las fracciones de menor tamaño molecular. Esto se debe a que la Hyp, Glu y Asp se concentraron en las fracciones de mayor tamaño molecular. Según Gómez-Guillén *et al.* (2010), la Hyp ayuda a estabilizar la estructura de triple hélice de colágeno, lo que dificulta la hidrólisis enzimática, por lo que es lógico pensar que este aminoácido prevalece en los péptidos de mayor tamaño molecular.

**Tabla 21.** Composición de aminoácidos de las diferentes fracciones peptídicas P1: fracción hidrolizada <1kDa de túnica de calamar desecada, P1-L: fracción hidrolizada <1kDa túnica de calamar liofilizada, F3: fracción hidrolizada <3kDa de escamas desmineralizada de dorada, GE3: fracción hidrolizada <3kDa de gelatina de escamas de dorada, ST1: fracción de hidrolizada < 1kDa de langostino

Nº residuos/1000 residuos					
Aminoácido	P1	P1-L	F3	GE3	ST1
<b>Asp</b>	56	54	41	41	82
<b>Thr</b>	46	46	28	28	40
<b>Ser</b>	77	77	64	64	49
<b>Glu</b>	75	72	66	66	115
<b>Gly</b>	229	219	326	327	185
<b>Ala</b>	99	101	123	123	90
<b>Cys</b>	1	1	1	1	4
<b>Val</b>	29	30	14	14	44
<b>Met</b>	25	21	14	14	22
<b>Ile</b>	20	23	4	5	35
<b>Leu</b>	63	57	18	18	69
<b>Tyr</b>	23	19	4	3	24
<b>Phe</b>	20	23	14	14	33
<b>Hyl</b>	9	8	7	7	2
<b>His</b>	15	14	5	5	17
<b>Lys</b>	39	39	25	25	75
<b>Arg</b>	66	64	48	49	60
<b>Hyp</b>	40	39	90	89	7
<b>Pro</b>	67	64	108	108	47





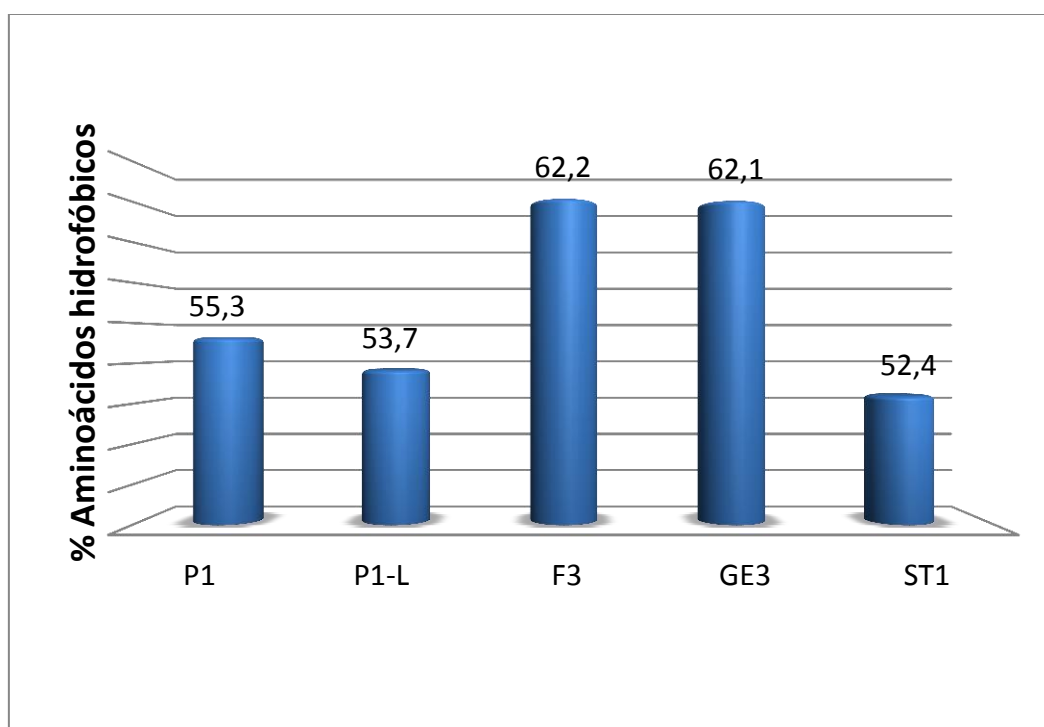
**Figura 34.** Perfil de aminoácidos de las diferentes fracciones peptídicas (Nº residuos/1000 residuos)

El perfil de aminoácidos de las fracciones de los hidrolizados de **túnica de calamar** desecada (P1) y liofilizada (LP1) fue similar. El mismo efecto se dio al comparar el perfil de aminoácidos de las fracciones procedentes de **escamas de dorada** desmineralizadas (F3) y de gelatina de escamas (GE3) (Tabla 21/Figura 34), lo que demuestra que el contenido de aminoácidos se conserva similar en las diferentes fracciones procedentes de la misma materia prima, independientemente de los tratamientos previos realizados y es un perfil característico de colágeno tipo I tanto en tónicas de calamar como en escamas de dorada.

La composición de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 34), fue notablemente superior en las fracciones procedentes de escamas de dorada. De igual manera, los contenidos de Pro fueron relativamente altos en las fracciones de túnica de calamar y escamas de dorada (Tabla 21 /Figura 34). La estructura del colágeno tipo I es rica en aminoácidos hidrofóbicos y en Pro, y se ha descrito que existen pocas diferencias en las cadenas de colágeno tipo I entre las diferentes especies de vertebrados (Friess, 1998). También se ha descrito que los hidrolizados obtenidos a partir de gelatina de calamar gigante poseen una menor proporción de aminoácidos hidrofóbicos que hidrolizados obtenidos a partir de otras especies marinas (Gómez-Guillén *et al.*, 2002). Este hecho se confirma en el presente estudio, ya que el perfil de aminoácidos de todas las fracciones procedentes de túnica de calamar son similares a los publicados anteriormente por otros autores para hidrolizados procedentes de la misma materia prima (Mendis *et al.*, 2005a; Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Alemán *et al.*, 2011a).

Es interesante destacar el elevado contenido en iminoácidos (Hyp+Pro) de los materiales que provienen del colágeno, en especial de los de Dorada, frente a los bajos valores obtenidos en el hidrolizado de langostino, lo que denota la baja proporción de colágeno en este material. Quizá el que la gelatina de escama de Dorada presente buena fuerza de gel y sea “competitiva” con las de animal de abasto en este sentido pueda deberse en gran parte a la presencia de este alto contenido en iminoácidos.

Por otro lado, en el hidrolizado de langostino destaca las elevadas cantidades de Asp, Lys y Glu entre otros. Además, el hidrolizado de **langostinos** presentó el menor contenido de aminoácidos hidrofóbicos y de glicina en comparación al resto de fracciones, por lo que presenta un carácter más hidrofílico.



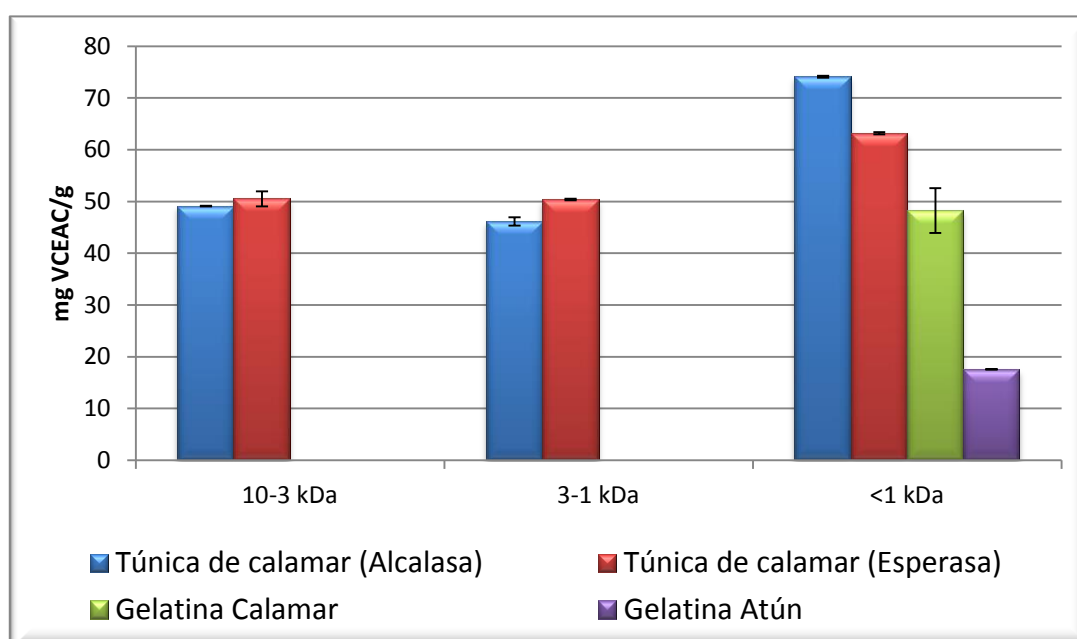
**Figura 35.** Porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos en las fracciones peptídicas. P1: fracción hidrolizada <1kDa de túnica de calamar desecada, P1L: fracción hidrolizada <1kDa túnica de calamar liofilizada, F3: fracción hidrolizada <3kDa de escamas desmineralizada de dorada, GE3: fracción hidrolizada <3kDa de gelatina de escamas de dorada, ST1: fracción de hidrolizada < 1kDa de langostino

#### 7.1.5. Actividades biológicas de las fracciones peptídicas

El presente trabajo se centró en el estudio de las actividades antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva mediante inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) e hipoglucemiante mediante inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Gran parte de las investigaciones existentes relacionan dichas actividades con el **tamaño molecular** de las fracciones peptídicas, coincidiendo en todos los casos que la mayor actividad se concentra en la fracción de menor tamaño (Jeon *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2007; Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Li-Chan *et al.*, 2012a). Para confirmar este efecto, se estudiaron las actividades antimicrobiana, antioxidante y antihipertensiva en diferentes fracciones procedentes del hidrolizado de túnica de calamar gigante (3-10 kDa, 1-3kDa y <1 kDa). En el resto de hidrolizados se separó directamente la fracción de tamaños moleculares inferiores a 3 kDa.

#### 7.1.5.1. Actividad Antioxidante mediante capacidad secuestrante de radicales libres

La actividad antioxidante de las diferentes fracciones del hidrolizado de **túnica de calamar** se detalla en la Figura 36. Tanto en las fracciones peptídicas de túnica de calamar liofilizada como en las fracciones de gelatina de calamar y gelatina de atún obtenidas por (Giménez *et al.*, 2009a), se pudo observar que la actividad se concentraba en la fracción de menor tamaño molecular (<1 kDa), especialmente en la fracción obtenida mediante hidrólisis con Alcalasa, que alcanzó valores de hasta 75 mg VCEAC/g. Sin embargo como se puede apreciar en fracciones de mayor peso molecular apenas hay diferencias entre los hidrolizados con Alcalasa o Esperasa.

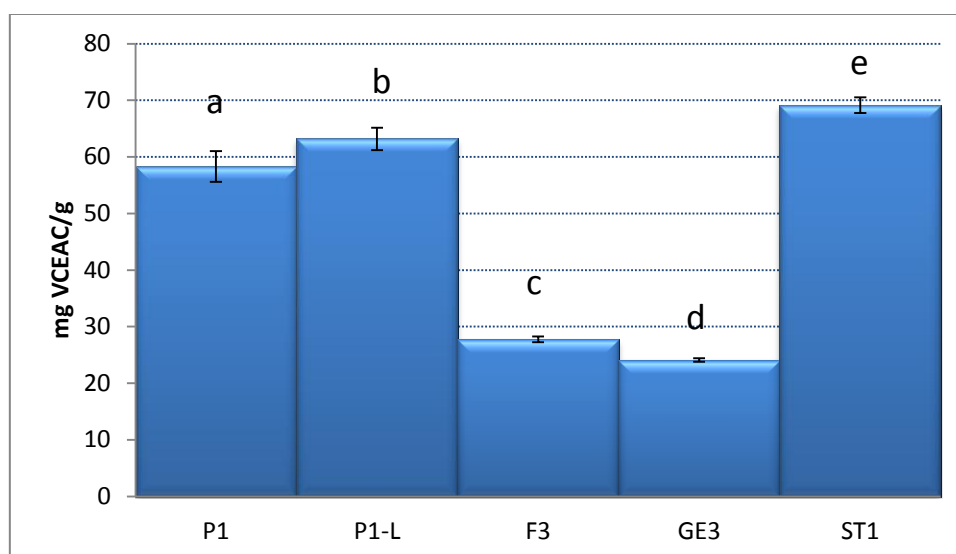


**Figura 36.** Actividad antioxidante de las fracciones peptídicas de túnica de calamar liofilizada. Fracción <1 kDa comparada con fracciones obtenidas de gelatina de calamar y gelatina de atún publicadas por (Giménez *et al.*, 2009a)

Varios estudios han determinado la mayor actividad antioxidante de sus hidrolizados proteicos en las fracciones peptídicas de bajo peso molecular (Byun *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2009; Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Sampath Kumar *et al.*, 2011). Por otra parte, todas las fracciones < 1 kDa obtenidas de la

hidrólisis directa de la túnica seca de calamar presentaron una mayor capacidad secuestrante de radicales ABTS que la obtenida en hidrolizados de gelatina de calamar (Giménez *et al.*, 2009a) (Figura 36).

La mayoría de los investigadores coinciden en atribuir la actividad antioxidante a diversos mecanismos que pueden darse juntos o de manera independiente, y se atribuyen a la presencia de diferentes aminoácidos favoreciendo un mecanismo u otro sobre los demás. Así por ejemplo, se espera que los péptidos ricos en aminoácidos hidrófobos sean adecuados para inhibir la peroxidación de lípidos tanto como donantes de protones a radicales peroxilo hidrófobos y como quelantes de iones metálicos. Por otro lado se ha referido en la bibliografía que péptidos que contienen His en sus secuencias actúan como quelantes de iones metálicos y lo atribuyen a la estructura de su anillo (Chen *et al.*, 1998; Megías *et al.*, 2007), en cambio otros autores observan un predominio de estructuras de carboxilo y amino en los grupos laterales de los aminoácidos ácidos y básicos y atribuyen al efecto quelante este predominio (Saiga *et al.*, 2003b). Los hidrolizados de la molécula de colágeno, ya sea a partir de gelatina o del propio colágeno y debido a su característica intrínseca de abundancia de Gly, Pro y Hyp, merecen una consideración especial. Mendis *et al.* (2005a) postularon que la reactividad elevada en el calamar se debía a equilibrio particionado en la secuencia entre aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos. Alemán *et al.* (2011b) indicaron además que los hidrolizados de túnica de calamar tienen un alto grado de glicosilación que puede contribuir a esta elevada actividad, mayor que en otras especies para las mismas fracciones y con los mismos enzimas utilizados para la obtención de hidrolizados.



**Figura 37.** Actividad secuestrante de radicales (ABTS) de las fracciones: P1: fracción hidrolizada <1kDa de túnica de calamar desecada, P1L: fracción hidrolizada <1kDa túnica de calamar liofilizada, F3: fracción hidrolizada <3kDa de escamas desmineralizadas de dorada, GE3: fracción hidrolizada <3kDa de gelatina de escamas de dorada, ST1: fracción de hidrolizada < 1kDa de langostino

En cuanto a las fracciones <3 kDa obtenidas a partir de escamas desmineralizadas y gelatina de escamas presentaron una capacidad secuestrante de radicales ABTS de  $27.74 \pm 0.2$  y  $24.1 \pm 0.3$  mg VCEAC/g respectivamente, siendo esta actividad muy inferior a la encontrada en el resto de fracciones estudiadas (Figura 37). La fracción <3 kDa del hidrolizado de langostinos presentó una actividad de  $69.1 \pm 1.4$  mg VCEAC/g. Se ha descrito que los aminoácidos aromáticos contribuyen en gran medida a la actividad antioxidante, debido a sus propiedades secuestrantes de radicales (Rajapakse *et al.*, 2005). Tanto P1, P1-L, y ST1 presentaron niveles similares de Phe y Tyr, siendo los niveles de estos dos aminoácidos muy inferiores en las fracciones de escamas (GE3 y F3). Por otra parte, existen evidencias de que Glu y Asp podrían actuar como quelantes de metales (Saiga *et al.*, 2003b). En el caso de estos dos aminoácidos, el contenido de los mismos en la fracción ST1 es aproximadamente 1.5 veces mayor que P1 y P1-L y 2 veces mayor que GE3 y F3 (Figura 34), lo cual podría ser una razón de la elevada actividad secuestrante de radicales ABTS encontrada en esta fracción peptídica.

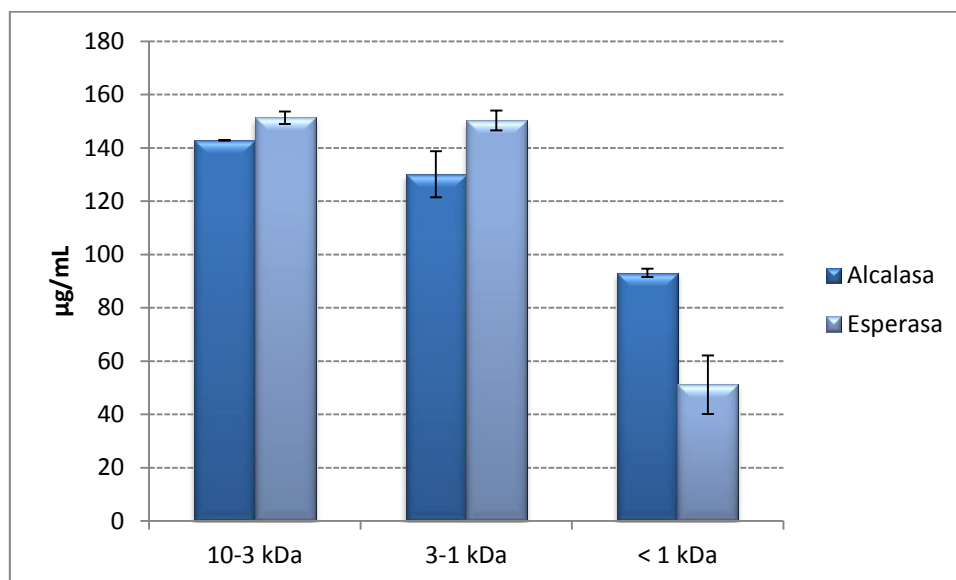
#### 7.1.5.2. Actividad antihipertensiva mediante inhibición de la ACE

La concentración de las diferentes fracciones obtenidas a partir de los hidrolizados de túnica de calamar, necesarias para inhibir el 50% de la actividad de la ACE ( $IC_{50}$ ) está representada en la Figura 38. Menores valores de  $IC_{50}$  indican mayor actividad. Tanto para los hidrolizados con Alcalasa como con Esperasa se comprobó que la actividad se fue concentrando en las fracciones de menor tamaño molecular, aunque en este caso fue el hidrolizado de Esperasa el que obtuvo mejor respuesta.

Aunque no se pueden comparar los resultados exactamente porque no están realizados en las mismas condiciones, Alemán *et al.* (2011a) obtuvieron hidrolizados de gelatina de esta misma especie con una actividad similar utilizando Alcalasa y Esperasa. En el estudio de estos autores la gelatina de túnica de calamar se hidrolizó con siete enzimas diferentes, resultando las actividades de los hidrolizados obtenidos con Esperasa y Alcalasa significativamente superiores al resto. En este caso los autores utilizan igual cantidad de enzima en ambos casos, y el grado de hidrólisis de la Esperasa fue muy inferior al obtenido para el caso de la Alcalasa. En el presente estudio, la cantidad de Esperasa utilizada es mayor que la de Alcalasa para que rindan un grado de hidrólisis semejante, pero la actividad así conseguida fue mejor para la Esperasa.

Estas fracciones fueron obtenidas mediante ultrafiltración, por lo que éste parece ser un método eficiente para concentrar la actividad inhibidora de la ACE en hidrolizados proteicos, y con un fácil escalado industrial. Esta hipótesis se corrobora mediante otros estudios, que utilizando esta misma técnica concentraron la actividad inhibidora de la ACE en la fracción de menor tamaño molecular, no solo para la misma procedencia ya mencionada, sino para especies y proteínas muy diferentes como por ejemplo Jung *et al.* (2006a) trabajando con un hidrolizado de lenguado (*Limanda aspera*). Un comportamiento similar ha sido descrito en hidrolizados de gelatina de bovino y de pepino de mar (Kim *et al.*, 2001a; Zhao *et al.*, 2007), músculo de pollo y de

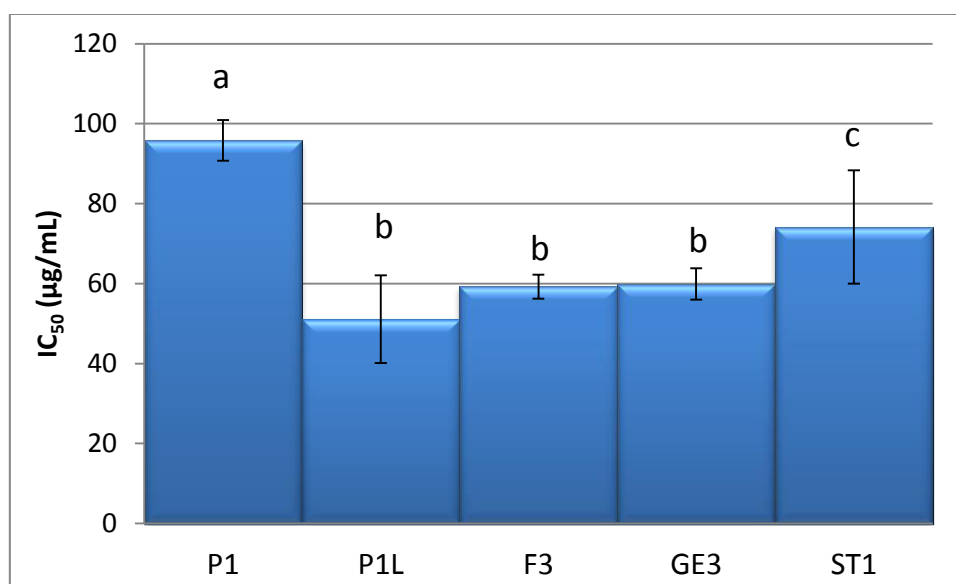
abadejo de Alaska (Saiga *et al.*, 2003a; Je *et al.*, 2004) o en hidrolizado de filetes de merluza (Cinq-Mars & Li-Chan, 2007), por citar unos ejemplos.



**Figura 38.** Actividad inhibidora ACE de las fracciones de los hidrolizados de Alcalasa y Esperasa de túnica de calamar

La actividad inhibidora de la ACE ( $IC_{50}$ ) de las diferentes fracciones obtenidas se compara en la Figura 39. Las fracciones procedentes de **túnica de calamar liofilizada, de escamas desmineralizadas y de gelatina de escamas** presentaron una actividad similar ( $p>0.05$ ). La fracción obtenida de túnica de calamar **desecada** presentó una actividad inferior a la de la túnica **liofilizada** ( $IC_{50}$  aproximadamente 2 veces mayor), que es atribuido a la mayor aptitud de la túnica liofilizada para la hidrólisis (Figura 32), permitiendo obtener una mayor proporción de péptidos de bajo peso molecular, como se observó en el perfil de tamaños moleculares (Figura 33).





**Figura 39.** Actividad inhibidora de la ACE de las diferentes fracciones peptídicas. P1: fracción hidrolizada <1kDa de túnica de calamar desecada, P1L: fracción hidrolizada <1kDa túnica de calamar liofilizada, F3: fracción hidrolizada <3kDa de escamas desmineralizada de dorada, GE3: fracción hidrolizada <3kDa de gelatina de escamas de dorada, ST1: fracción de hidrolizada < 1kDa de langostino

La fracción procedente de langostinos (ST1) fue la que presentó el grupo peptídico de menor tamaño molecular, sin embargo su valor de IC<sub>50</sub> fue ligeramente superior que F3 y GE3, por lo que parece que sean los péptidos comprendidos en las fracciones de 1550 -1200 kDa los que juegan un papel fundamental en esta actividad.

El tamaño medio de los péptidos no es el único factor que influye en la actividad inhibidora de la ACE. Se ha descrito que el contenido de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo C-terminal de la cadena peptídica es característico en los péptidos inhibidores de la ACE (Cheung *et al.*, 1980; Chen *et al.*, 1995). Además, en varios estudios se ha descrito que la presencia de Pro podría aumentar considerablemente la actividad inhibidora (Gómez-Ruiz *et al.*, 2004a; Gómez-Ruiz *et al.*, 2004b; Quirós *et al.*, 2007; Pihlanto *et al.*, 2008; Contreras *et al.*, 2009). En el presente estudio, las fracciones de escamas y de gelatina de escamas (<3 kDa) mostraron el mayor contenido de aminoácidos hidrofóbicos y de Pro (Tabla 21 /Figura 34), a pesar de haber sido fraccionados

por 3 kDa en vez de 1kDa, y de tener péptidos de mayor tamaño molecular de acuerdo al análisis de tamaños moleculares por SEC-HPLC (Figura 33). En cuanto al hidrolizado de langostinos, se caracteriza por un menor contenido de aminoácidos hidrofóbicos y de prolina que los hidrolizados de material colagenoso, lo que no influye notablemente en su capacidad de inhibir la ACE. Alemán *et al.* (2011b) observaron que en secuencias peptídicas con actividad inhibidora de ACE la presencia de Leu e Hyp juegan un papel fundamental; en especial la Leu, aminoácido abundante en la fracción ST1.

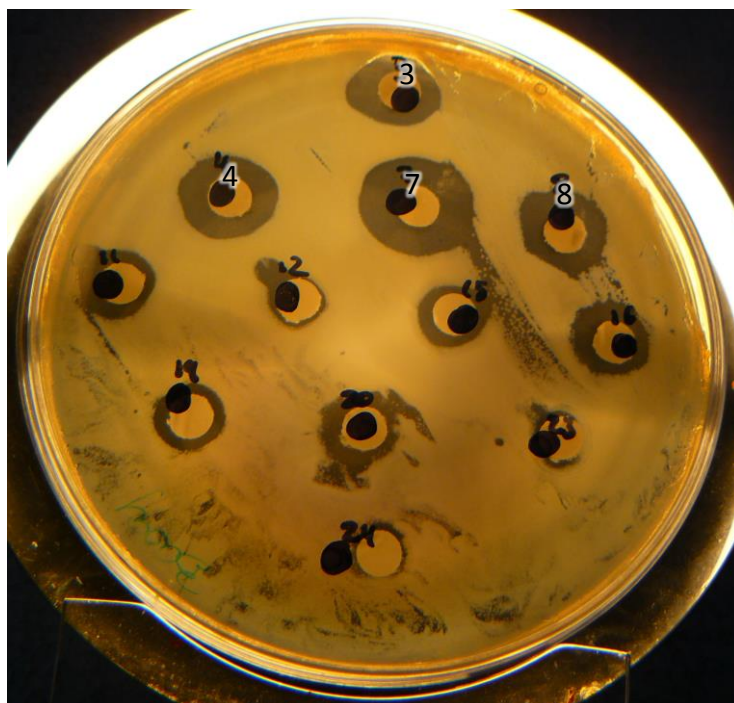
Todas las fracciones obtenidas en este estudio son mucho menos potentes que los inhibidores comerciales como el **Enalapril®** ( $IC_{50} = 2.7 \mu\text{g/mL}$ ; Alemán *et al.*, 2011c), sin embargo el consumo de esta droga sintética puede ocasionar diversos efectos adversos en el organismo (Messerli, 1999; Tabacova & Kimmel, 2001), que de momento no se han descrito para los hidrolizados proteicos.

El valor  $IC_{50}$  de la actividad inhibidora de la ACE determinado en las fracciones obtenidas fue menor que la descrita en la mayor parte de trabajos publicados. Zhao *et al.* (2007) describieron valores  $IC_{50}$  de 350  $\mu\text{g/mL}$  para la fracción <1 kDa de gelatina de pepino de mar, He *et al.*, (2006) determinaron un valor  $IC_{50}$  de 220  $\mu\text{g/mL}$  para una fracción <3 kDa de gamba o 115  $\mu\text{g/mL}$  para una fracción <1 kDa de músculo de merluza (Samaranayaka *et al.*, 2010). Cinq-Mars & Li-Chan (2007) por otra parte, publicaron valores  $IC_{50}$  de alrededor de 40  $\mu\text{g/mL}$  para fracciones <3 y <5 kDa obtenidos mediante ultrafiltración a partir de un hidrolizado de merluza. Los valores más cercanos son los encontrados por (Alemán *et al.*, 2011c) para hidrolizados de gelatinas de pieles tónicas de calamar de la fracción <3kDa y para secuencias peptídicas purificadas de esta fracción (Alemán *et al.*, 2011b).

#### 7.1.5.3. Actividad antimicrobiana

De los diferentes hidrolizados y fracciones obtenidas, solo las procedentes de túnica de calamar presentaron actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana de estas fracciones peptídicas se encuentra detallada en la

Figura 41. De las 26 cepas microbianas probadas, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* (Figura 40), *Debaryomyces hansenii* y *Pseudomonas fluorescens* fueron las que presentaron mayor sensibilidad a las fracciones peptídicas de túnica de calamar, en especial las menores de 3 kDa. Por otra parte, la fracción más eficaz en la inhibición del crecimiento de los microorganismos fue la comprendida entre 1-3 kDa obtenida con Esperasa, que inhibió 20 de las 26 cepas microbianas, seguida de las fracciones de 1-3 y < 1 kDa obtenidas con Alcalasa, que inhibieron 14 cepas, y la fracción < 1 kDa obtenida con Esperasa, que fue efectiva frente a 13 cepas microbianas.



**Figura 40.** Halos de inhibición producidos por diferentes fracciones peptídicas en una placa inoculada con *B. coagulans*. Halos **3 y 4** corresponden a las fracciones de 1-3 kDa y < 1 kDa obtenidas de la hidrólisis de túnica de calamar con Alcalasa; halos **7 y 8** corresponden a las fracciones de 1-3 kDa y < 1 kDa obtenidas de la hidrólisis de túnica de calamar con Esperasa.



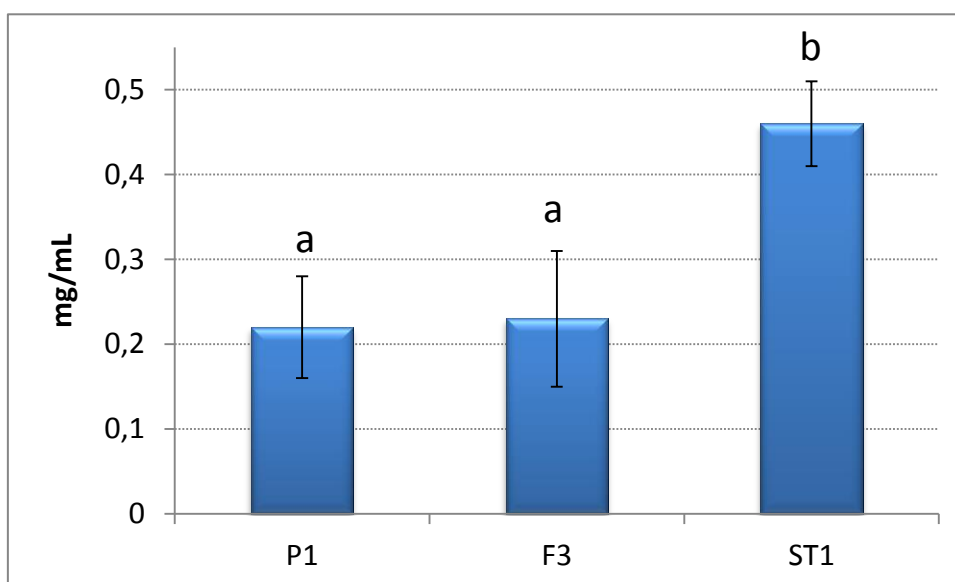
**Figura 41.** Actividad antimicrobiana de las fracciones peptídicas de túnica de calamar (5 mg/mL); Hidrólisis con Alcalasa a) 1-3 kDa b) <1 kDa; Hidrólisis con Esperasa c) 1-3 kDa d) <1 kDa. Las barras representan el tamaño de los halos de inhibición producidos por las fracciones peptídicas.

La actividad de la mayoría de los péptidos antimicrobianos en términos generales se debe a una interacción con la membrana celular del microorganismo, en la cual los péptidos tienden a formar canales por los cuales atraviesan la bicapa lipídica alcanzando el citoplasma, donde pueden provocar la floculación del contenido intracelular. Por otra parte, los péptidos pueden alterar la formación del tabique que divide al citoplasma durante la telofase, inhibir la síntesis de pared celular, la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis de proteínas o la actividad enzimática de la célula (Gobbetti *et al.*, 2004; Brogden, 2005). En el presente estudio, solo las fracciones de túnica de calamar menores de 3 kDa presentaron actividad antimicrobiana. Se ha relacionado la actividad antimicrobiana con el menor tamaño de las fracciones peptídicas (Gómez-Guillén *et al.*, 2010). Además, existen evidencias de que el contenido de aminoácidos hidrofóbicos en la fracción peptídica podría influir positivamente la presencia de esta actividad (Wieprecht *et al.*, 1997). De una manera más detallada Téllez & Castaño (2010) citaron: “La mayoría de los péptidos antimicrobianos son catiónicos, lo que significa que tienen una carga positiva a un pH fisiológico, debido al gran contenido de arginina y lisina (residuos cargados positivamente) en relación con el de ácido aspártico y ácido glutámico (residuos cargados negativamente), generalmente, con una carga neta entre +2 y +9 y una proporción substancial ( $\geq 30\%$ ) de residuos hidrofóbicos”. Estos autores describieron además que los péptidos antimicrobianos por lo general adoptan estructuras anfipáticas. Esta característica es la que ayuda a que se produzca una interacción con la membrana celular de los microorganismos (Hancock & Patrzykat, 2002; Jenssen *et al.*, 2006). Cabe destacar que la actividad antimicrobiana de las fracciones peptídicas fue realizada ajustando el pH de las diluciones de las soluciones de estas fracciones peptídicas a pH7. Las fracciones peptídicas procedentes de túnica de calamar presentaron una mayor relación de aminoácidos positivamente cargados (His, Lys, Arg) frente a los negativamente cargados (Asp, Glu), al compararlas con el resto de fracciones obtenidas, lo que podría justificar en parte la manifestación actividad antimicrobiana en estas fracciones.

#### 7.1.5.4. Actividad hipoglucemiante mediante inhibición de la DPP-IV

La actividad inhibidora de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) se determinó en las fracciones peptídicas P1 (fracción <1kDa de túnica de calamar desecada), F3 (fracción <3kDa de escamas desmineralizada de dorada) y ST1 (fracción < 1kDa de langostino) (Figura 42). Las fracciones peptídicas procedentes de materiales ricos en colágeno presentaron el doble de actividad inhibidora que la fracción obtenida de la hidrólisis de langostinos enteros, sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre las fracciones P1 y F3 ( $p>0.05$ ).

La actividad inhibidora de la DPP-IV, al igual que las actividades anteriormente estudiadas, parece estar ligada en parte al tamaño molecular de la fracción peptídica. Li-Chan *et al.* (2012a) determinaron la mayor actividad inhibidora de la DPP-IV en la fracción peptídica <1 kDa procedente de un hidrolizado de gelatina de salmón del Atlántico ( $IC_{50} = 1.35$  mg/mL). Similar efecto pudieron observar (Hsu *et al.*, 2013) en fracciones obtenidas a partir de gelatina porcina, donde la fracción <1 kDa presentó un  $IC_{50}$  de 1.5 mg/mL.



**Figura 42.** Actividad inhibidora de la DPP-IV las fracciones peptídicas; P1: fracción hidrolizada <1kDa de túnica de calamar desecada, F3: fracción hidrolizada <3kDa de escamas desmineralizada de dorada, ST1: fracción de hidrolizada < 1kDa de langostino

Se ha descrito también que la fuente proteica así como la enzima utilizada para la hidrólisis influyen en gran medida en la actividad inhibidora presente en la fracción peptídica. Lacroix & Li-Chan (2012) observaron este efecto, al estudiar la actividad inhibidora de la DPP-IV en hidrolizados y fracciones peptídicas procedentes de caseinato sódico y proteína de suero de leche.

Sin embargo, el principal factor que influye en la actividad inhibidora de la DPP-IV parece ser la estructura de la cadena peptídica. La GLP-1 y GIP, principales hormonas incretinas, inactivadas por la DPP-IV contienen un residuo de Ala en la penúltima posición del extremo N-terminal (Baggio & Drucker, 2007). Algunos estudios apuntan a que la DPP-IV tiene una especificidad de sustratos tipo Xaa-Ala-Yaa o Xaa-Pro-Yaa, con la Pro o Ala en el extremo N-terminal (Harada *et al.*, 1982; Yazbeck *et al.*, 2009), siendo la mayor parte de péptidos inhibidores de la DPP-IV descritos, aquellos que poseen una Pro en el extremo N-terminal (Mentlein, 1999; Li-Chan *et al.*, 2012a; Hsu *et al.*, 2013; Power *et al.*, 2013). Harada *et al.* (1982) pudieron comprobar además, que los péptidos Pro-Gly y Pro-Gly-Gly no presentaron inhibición alguna a diferencia de los péptidos Pro-Pro y Pro-Pro-Pro-Pro, lo que indica que no es la simple presencia de Pro (o Ala) la que influye en esta actividad, sino que estos aminoácidos deben estar presentes exclusivamente (sea el uno o el otro) en la penúltima posición del extremo N terminal de la cadena peptídica. Es evidente que la actividad inhibidora de la DPP-IV depende principalmente de la cadena peptídica, sin embargo, en hidrolizados proteicos y sus fracciones peptídicas, el contenido de Ala y Pro en su composición de aminoácidos podría ser un indicador no determinante de la posible presencia de péptidos inhibidores de la DPP-IV.

En el presente estudio, las fracciones P1 y F3 presentaron mayores contenidos de Ala y Pro que ST1 (Figura 34), sin embargo F3 presentó un mayor contenido de estos aminoácidos que P1, pero la misma actividad. Quizás el menor tamaño molecular de P1 (Figura 33) influyó en la igualdad de la actividad frente a F3 a pesar de no presentar la misma proporción de Pro y Ala en su composición de aminoácidos. Hay que recordar que tanto las escamas desmineralizadas como la túnica de calamar son tejidos ricos en colágeno tipo I

y tanto los hidrolizados precursores de P1 como F3 fueron obtenidos utilizando la misma enzima (Esperasa) y bajo las mismas condiciones, por lo que es de esperar que los sitios de corte de la enzima hayan sido similares, es decir, gran parte de los péptidos presentes en dichas fracciones podrían ser muy similares entre sí, y éstos a su vez los principales responsables de la presencia de la actividad inhibidora de la DPP-IV en ambas fracciones.



## **7.2. Encapsulación de hidrolizados peptídicos en nanoliposomas de fosfatidilcolina**

Los liposomas son estructuras coloidales, constituidos por una o más bicapas de fosfolípidos que encapsula un volumen concreto de solución acuosa. Se prepara a partir de componentes lipídicos naturales y normalmente económicos. La encapsulación en liposomas de sustancias activas se realiza por diferentes motivos, en general para estabilizar, proteger de actuaciones enzimáticas, pH, sales y la presencia de otros compuestos en solución que no les sean favorables, en definitiva tiene la función de proteger. Sin embargo, además de actuar como vehículo para fármacos y bioactivos han de tener la capacidad de liberar de manera controlada dicha actividad para que se manifieste. La encapsulación en liposomas está ampliamente utilizada desde hace muchos años en la industria farmacológica y cosmética como vehículo de principios activos y complementos nutricionales. Sin embargo está mucho menos estudiada su aplicación en alimentos.

Para la encapsulación de las fracciones peptídicas en nanoliposomas de fosfatidilcolina (PC) se escogieron tres fracciones peptídicas, una de cada especie, seleccionadas de acuerdo a sus actividades biológicas y a su reproducibilidad en la industria.

De los hidrolizados de **túnica de calamar** se utilizó la fracción <1 kDa procedente de túnica desecada. A pesar de que las túnicas liofilizadas presentaron una aptitud para la hidrólisis ligeramente mayor, el proceso de secado con ventilación de aire forzado ofrece mayores ventajas económicas al momento de conservar la materia prima, frente a la congelación y a la liofilización. Para más detalle ver capítulo 6.4

En el caso de los hidrolizados de **escamas**, se escogió la fracción <3 kDa de escamas desmineralizadas, ya que posee igual actividad que la fracción equivalente de gelatina de escamas, con la ventaja de que se evita el proceso de extracción de gelatina y además se consiguen mayores rendimientos. Para más detalle ver capítulo 6.3

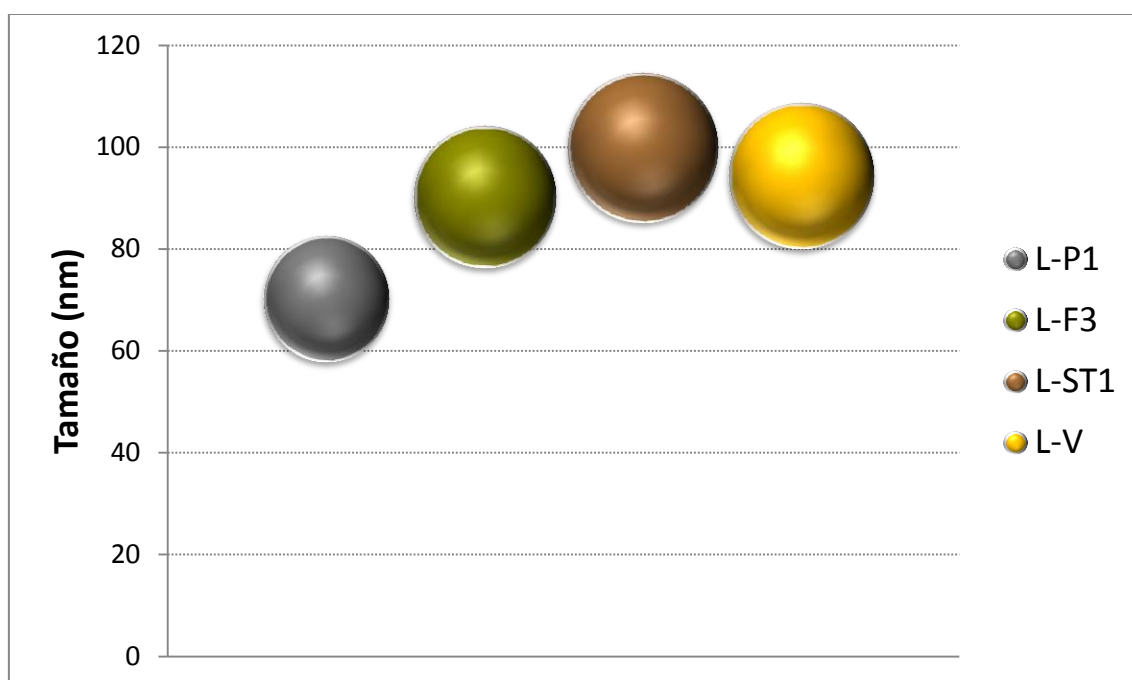
La tercera fracción utilizada fue la de <3 kDa procedente de hidrolizado de **langostinos** enteros. En este caso se evitó la separación de los distintos tipos de tejidos, pensando en la facilidad para la industria de hidrolizar las piezas enteras, que por diversos motivos son desechadas. Para más detalle ver capítulo 6.5

Para la **encapsulación** de las fracciones peptídicas se usaron dos métodos de encapsulación, el **método de hidratación de la película** y el **método de calentamiento**, tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Las suspensiones obtenidas fueron caracterizadas tomando en cuenta los siguientes parámetros: El tamaño medio de los liposomas, el índice de polidispersidad, la eficiencia de encapsulación y el potencial zeta.

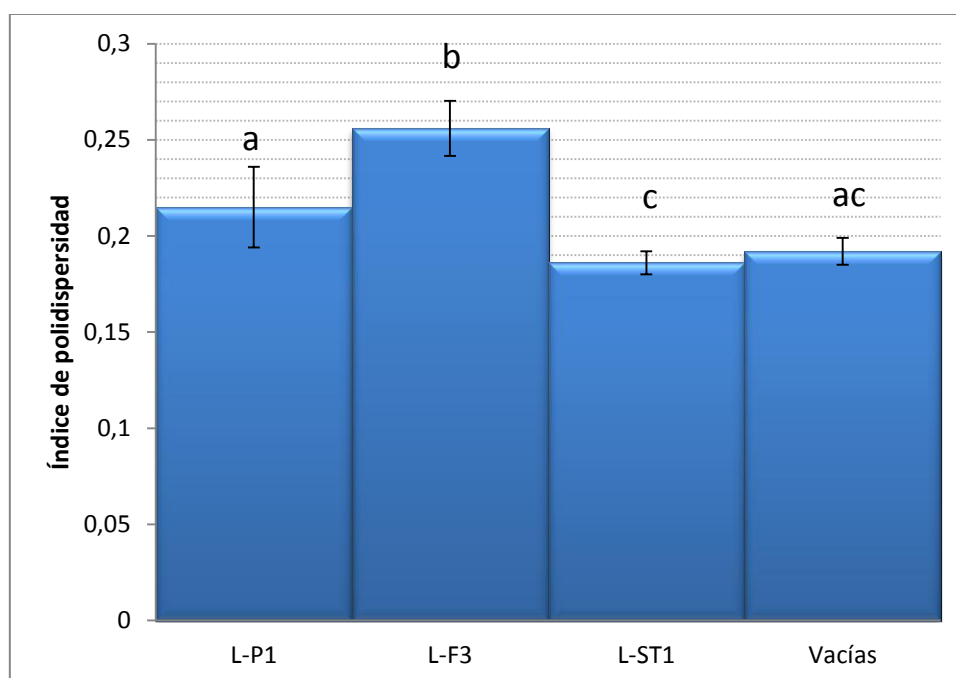
### 7.2.1. Tamaño y polidispersidad de los liposomas

Los **tamaños de los liposomas** obtenidos presentaron ligeras diferencias entre sí ( $p < 0.05$ ), independientemente del método de encapsulación, la cantidad de PC y la concentración de las fracciones peptídicas utilizadas (Figura 43). Uno de los principales factores que influyen en el tamaño medio de los liposomas es las condiciones de sonicación (Silva *et al.*, 2008; Honary & Zahir, 2012). En el presente estudio se procuró mantener condiciones similares de sonicación en todos los casos (determinadas en estudios preliminares), independientemente del método de encapsulación utilizado. En concordancia con los resultados del presente estudio, se han descrito diámetros de alrededor de 100 nm para liposomas fabricados con PC encapsulando péptidos y preparados mediante el método de hidratación de la película (Were *et al.*, 2003; da Silva Malheiros *et al.*, 2011). El tamaño de los liposomas es un factor importante a tomarse en cuenta, ya que existen evidencias de que mientras menor es el tamaño de los liposomas más eficiente la liberación controlada de un compuesto dentro del organismo (Nagayasu *et al.*, 1995; Nagayasu *et al.*, 1999; Ramezani *et al.*, 2009).



**Figura 43.** Tamaño de los liposomas (nm). L-P1: liposoma conteniendo fracción hidrolizada <1kDa de túnica de calamar desecada, L-F3: liposoma conteniendo fracción hidrolizada <3kDa de escamas desmineralizada de dorada, L-ST1: liposoma conteniendo fracción de hidrolizada < 1kDa de langostino, L-V: liposoma vacío.

La muestra que presentó el menor tamaño promedio fue L-P1 frente a L-F3, ambas de material colagenoso, las cuales fueron obtenidas utilizando el mismo método de encapsulación (hidratación de la película). Sin embargo, en la optimización de L-F3 se encontraron diámetros medios entre 84 y 123 nm, al igual que en el estudio de L-P1 donde se encontraron diámetros medios entre 69 y 110 nm, por lo que no se puede afirmar que la diferencia de tamaño entre los diferentes tratamientos sea influenciada por alguna de las variables utilizadas en el proceso de encapsulación, o por las propiedades físico-químicas de las fracciones peptídicas encapsuladas. Al incorporar nisina en liposomas de PC, Taylor *et al.* (2007) determinaron un tamaño medio similar de los liposomas al encapsular una concentración de 5 mg/mL y una concentración de 10 mg/mL. Sin embargo, en el mismo trabajo, los liposomas vacíos presentaron el menor tamaño. En el presente estudio, los liposomas vacíos, preparados mediante el método de calentamiento, mostraron también un diámetro menor ( $p < 0.05$ ) que el de los liposomas encapsulando ST1.



**Figura 44.** Polidispersidad de los liposomas. L-P1: liposoma conteniendo fracción hidrolizada <1kDa de túnica de calamar desecada, L-F3: liposoma conteniendo fracción hidrolizada <3kDa de escamas desmineralizada de dorada, L-ST1: liposoma conteniendo fracción de hidrolizada < 1kDa de langostino, L-V: liposoma vacío.

La **polidispersidad** de los liposomas fue menor de 0.25 en todos los casos (Figura 44), encontrándose valores ligeramente menores de polidispersidad en las muestras preparadas mediante el método de calentamiento. Se ha descrito que para sistemas preparados a partir de materiales biológicos, es esperable encontrar valores de polidispersidad en un rango entre 0.2 y 0.3 (da Silva Malheiros *et al.*, 2011).

### 7.2.2. Eficiencia de encapsulación

Las eficiencias de encapsulación para L-P1, L-F3 y L-ST1 fueron de  $53.2 \pm 1.3$ ,  $74.6 \pm 0.9$  y  $52.4 \pm 2.4$  respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre fracciones de túnicas de calamar y langostino entero (L-P1 y L-ST1). En el presente estudio, la eficiencia de encapsulación mostró estar relacionada con la concentración de péptido encapsulado y la concentración de fosfatidilcolina utilizada en las muestras preparadas bajo el método de hidratación de la película. Posiblemente ésta sea una de las limitantes de este

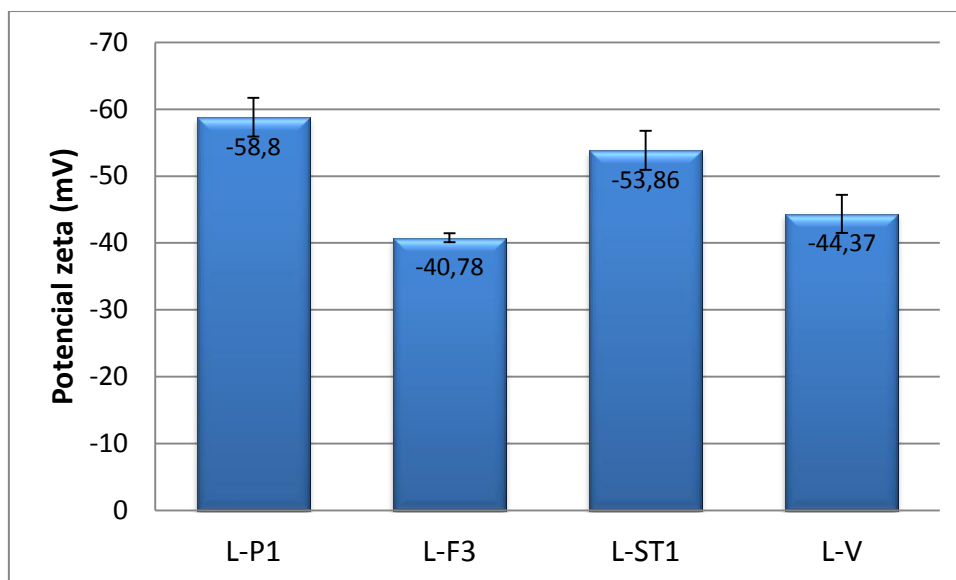
método, ya que mientras más grueso sea la película formada por el lípido, existe una menor superficie de contacto en proporción a la cantidad de lípido utilizado. El método de calentamiento permitió utilizar una mayor concentración de PC y péptidos, en comparación al método de hidratación de la película, obteniendo resultados similares a los obtenidos para L-P1. Se ha descrito que la eficiencia de encapsulación depende del tipo de lípido o lípidos utilizados, el tipo de compuesto bioactivo utilizado, el método de preparación de los liposomas, así como las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre los fosfolípidos y los péptidos (Riaz, 1996; Were *et al.*, 2003).

Con respecto a L-F3, que mostró la mayor eficiencia de encapsulación, ésta posiblemente esté ligada a la mayor concentración de aminoácidos hidrofóbicos de la fracción peptídica (Figura 35). Según Riaz (1996), las eficiencias de encapsulación de compuestos hidrofóbicos son usualmente elevadas, independientemente de la composición lipídica o tipo de liposoma.

### **7.2.3. Estabilidad de los liposomas**

La estabilidad de los diferentes liposomas obtenidos se determinó mediante el potencial zeta de las dispersiones (Figura 45). La mayor estabilidad se encontró en L-P1 seguida de L-ST1. El potencial zeta es la medida de la carga de la superficie de los liposomas, y es utilizado como índice de estabilidad de una dispersión coloidal (Hans & Lowman, 2002). Mientras mayores son los valores de potencial zeta (positivos o negativos), mayores son las repulsiones electrostáticas entre partículas, por lo que disminuye la frecuencia de las colisiones entre las mismas, lo que significa una mayor estabilidad del sistema (da Silva Malheiros *et al.*, 2010). En la optimización de L-F3 se determinó una relación entre la concentración de F3, la concentración de PC y la estabilidad de los liposomas. La misma relación entre la concentración de la fracción peptídica y la estabilidad se confirmó al encapsular P1. En este último caso se pudo ver que después de una semana de almacenamiento a 4° C, mientras más se acercaban las muestras a la concentración óptima de encapsulación, la pérdida de potencial zeta era menor (Figura 45). Según Müller *et al.* (2001) un

potencial zeta de  $\pm 30$  mV es el requerido para conseguir una nanosuspensión físicamente estable, estabilizada únicamente mediante repulsión electrostática.

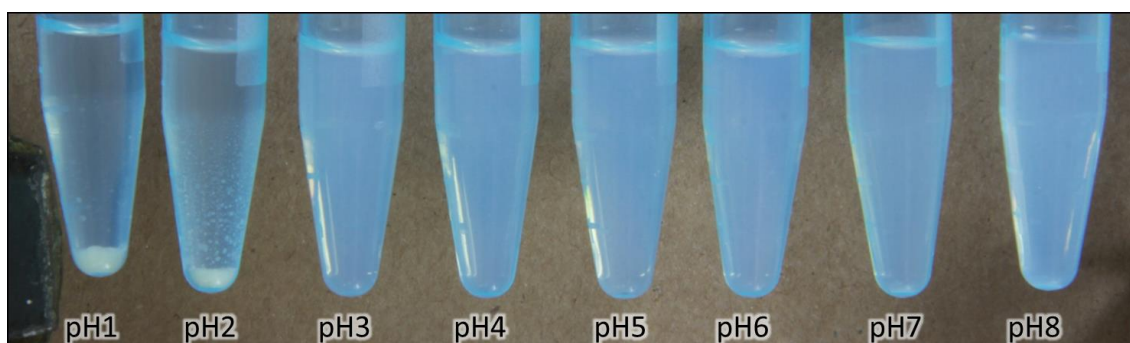


**Figura 45.** Potencial zeta de los liposomas. L-P1: liposoma conteniendo fracción hidrolizada <1kDa de túnica de calamar desecada, L-F3: liposoma conteniendo fracción hidrolizada <3kDa de escamas desmineralizada de dorada, L-ST1: liposoma conteniendo fracción de hidrolizada < 1kDa de langostino, L-V: liposomas vacíos

Con respecto a los liposomas obtenidos mediante el método de calentamiento, L-ST1 presentó valores inferiores a -50 mV, muy cercanos a los obtenidos para L-P1, lo que junto a la eficiencia de encapsulación, el tamaño y polidispersidad de los liposomas, demuestran la eficacia de este método al encapsular ST1. Los liposomas vacíos preparados bajo el método de calentamiento presentaron un valor de potencial zeta de -44 mV mostrando menor estabilidad en comparación a L-ST1, pero mucho más estables a los descritos por Taylor *et al.* (2008) (-8 mV), para vesículas vacías fabricadas con PC. La composición de fosfolípidos y sus interacciones con el compuesto encapsulado puede determinar la carga de la superficie de los liposomas, además la presencia de otros lípidos en la composición de los fosfolípidos podrían modificar la carga de la partícula (da Silva Malheiros *et al.*, 2011). Por todo lo expuesto, el proceso de purificación de la PC a partir de la lecitina es un punto que podría determinar

las características finales de los liposomas, especialmente las del potencial zeta, incrementando además la variabilidad entre diferentes muestras.

También se encontraron cambios negativos en el potencial zeta al cambiar el pH del medio, aunque los liposomas presentaron valores inferiores a -30 mV entre pH 3 y 7 (Figura 46) por lo que se muestran muy estables en un margen amplio de acidez a la hora de aplicarlo en sistemas alimentarios, por otro lado mucho más abundantes que sistemas alcalinos, mientras que cabe suponer una mayor inestabilidad en el tracto intestinal por lo que se facilitaría la liberación del compuesto bioactivo.



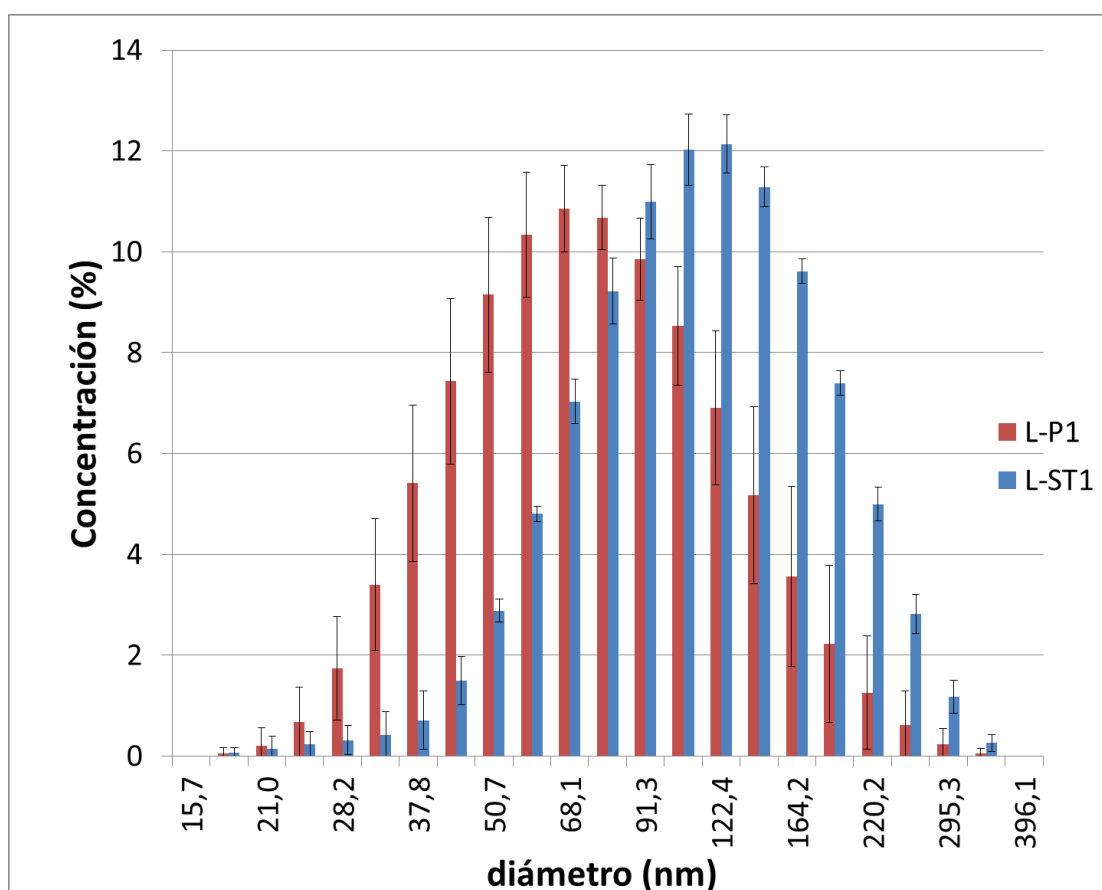
**Figura 46.** Estabilidad de los liposomas encapsulando P1 a diferentes valores de pH. La figura hace referencia a la prueba descrita en el capítulo 6.4 y en concordancia con los datos presentados en la Tabla 17.

A modo de resumen, en la Tabla 22 se detallan los valores obtenidos para tamaño, polidispersidad, potencial zeta y eficiencia de encapsulación de los diferentes liposomas obtenidos a lo largo del estudio.

Hay que notar que aunque existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, no existe uno en el cual se pueda afirmar que todas las características de los liposomas son mejores en su conjunto, Por ejemplo en L-P1 se consiguió la mayor estabilidad, el menor tamaño medio de los liposomas, sin embargo, la mayor eficiencia de encapsulación se obtuvo en la encapsulación de F3 y la menor polidispersidad en la encapsulación de ST1.

**Tabla 22.** Caracterización de los liposomas. L-P1: liposoma conteniendo fracción hidrolizada <1kDa de túnica de calamar desecada, L-F3: liposoma conteniendo fracción hidrolizada <3kDa de escamas desmineralizada de dorada, L-ST1: liposoma conteniendo fracción de hidrolizada < 1kDa de langostino, L-V: liposomas vacíos

Fracción	L-P1	L-F3	L-ST1	L-V
Tamaño medio	70.3±6.03 <sup>a</sup>	90.3±4.3 <sup>b</sup>	99.98±4.2 <sup>c</sup>	94.4±2.4 <sup>bc</sup>
Polidispersidad	0.215±0.021 <sup>a</sup>	0.256±0.014 <sup>b</sup>	0.186±0.006 <sup>c</sup>	0.192±0.007 <sup>ac</sup>
Potencial zeta	-58.8±2.91 <sup>a</sup>	-40.78±0.67 <sup>b</sup>	-53.86±2.91 <sup>c</sup>	-44.37±2.85 <sup>d</sup>
Eficiencia de encapsulación	53.18±1.32 <sup>a</sup>	74.6±0.9 <sup>b</sup>	52.37±2.38 <sup>a</sup>	



**Figura 47.** Distribución de tamaños de las nanovesículas. L-P1: Liposomas preparados mediante el método de hidratación de la película encapsulando la fracción < 1 kDa de túnica de calamar (P1); L-ST1: Liposomas preparados mediante el método de calentamiento encapsulando la fracción < 3 kDa de langostinos.



Por otra parte, si se puede destacar que el método de calentamiento resultó mucho más eficiente que el método de hidratación de la película, ya que aunque el tamaño de los liposomas resultó ligeramente mayor que por el primer método (Figura 47), no solo se encapsuló una concentración superior de péptidos, sino que los lotes fueron de 100 mL de suspensión, frente a los lotes de 4mL que se pueden obtener utilizando el método de hidratación de la película.

### 7.3. Aplicaciones tecnológicas de los encapsulados

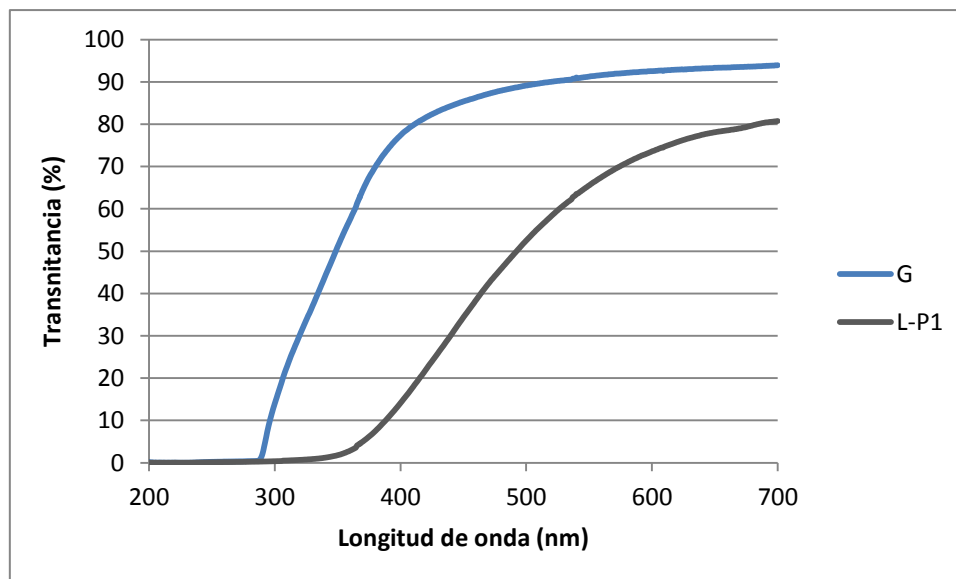
Los liposomas han sido ampliamente utilizados en la industria farmacéutica para la encapsulación de diferentes medicamentos, sin embargo, en la industria alimentaria podrían ofrecer una alternativa para la mejora de la eficacia y estabilidad de sustancias bioactivas en la formulación de alimentos funcionales (Rao *et al.*, 1994; Mozafari *et al.*, 2008b). En la presente Memoria se incorporaron nanoliposomas en dos matrices alimentarias (gel de gelatina y película de caseína) y se evaluaron las características de cada uno de los productos obtenidos. Para más detalle ver capítulos 6.4 y 6.5.

#### 7.3.1. Nanoliposomas en gel de gelatina

Con el fin de aplicar los nanoliposomas en la industria alimentaria se procedió a incorporarlo en un gel como sistema alimentario, para ello se seleccionó la gelatina. Se utilizó la fracción peptídica < 1kDa de túnica de calamar con alta actividad antihipertensiva (P1), para encapsularlos en liposomas y a su vez proceder a su inclusión en geles de gelatina. Se utilizó gelatina disuelta en tampón fosfato 10 mM pH 7, para favorecer la estabilidad de los liposomas. Con fines comparativos, se realizó el estudio reológico de la gelatina con la fracción peptídica encapsulada (L-P1), la gelatina adicionada de la misma fracción peptídica sin encapsular (P1) y también de la gelatina sin péptidos, como control. El estudio de viscoelasticidad dinámica de las suspensiones en frío en función de la frecuencia angular, reveló que todas las muestras presentaron un comportamiento típico de gel tras una breve maduración en frío ( $G' > G''$ ). Los geles con L-P1 y P1 mostraron valores ligeramente mayores de  $G'$  y  $G''$  que el control (gelatina sola), lo que indica un cierto reforzamiento de la estructura del gel por la presencia de las nanocápsulas. La estabilidad estructural de los geles prácticamente no se vio afectada por la incorporación de L-P1 dado que el exponente de la ley de la potencia  $n'$  fue similar en todos los casos. Ligeras diferencias se encontraron al incorporar P1, que a la máxima concentración estudiada (26.12mg/g) exhibió un incremento notable de  $n'$ , que sugiere que por encima de esa concentración se produce un detrimento de la

estabilidad del gel, probablemente debido a las interacciones entre los péptidos libres de P1 y las cadenas polipeptídicas de la gelatina. Esto no ocurrió en la gelatina con los péptidos encapsulados.

Al analizar el comportamiento de los geles mediante rampas de temperatura de calentamiento y enfriamiento, no se observaron diferencias en la estabilidad térmica de los geles, ya que no se modificaron las temperaturas de gelificación y de fusión por la presencia de los péptidos libres o encapsulados en liposomas. Se encontró un ligero reforzamiento del gel al incorporar P1 (26.12 mg/g), siendo el reforzamiento aún mayor al incorporar L-P1 (encapsulando la misma concentración de P1). Otros autores han descrito el mismo efecto al incorporar liposomas en geles de gelatina, es decir, un incremento de la fuerza del gel, sin cambios significativos en la estabilidad térmica de los mismos (DiTizio *et al.*, 1998; DiTizio *et al.*, 2000).



**Figura 48.** Transmitancia óptica a diferentes longitudes de onda: G= gel de gelatina (6.67%); L-P1= Gel de gelatina (6.67%) con nanovesículas encapsulando la fracción <1 kDa de túnica de calamar (P1)

Por otra parte, se pudieron determinar diferencias en el color y transmitancia óptica de los geles al incorporar las nanovesículas. El gel con liposomas presentó un porcentaje inferior de transmitancia en comparación con el gel sin nanovesículas (Figura 48), además los geles con liposomas mostraron mayores valores de luminosidad y una mayor tendencia al color verde (Tabla 23). El espacio de color amarillo – azul ( $b^*$ ) fue idéntico en ambos casos.

**Tabla 23.** Color ( $L^*a^*b^*$ ): G = gel de gelatina (6.67%); L-P1 = Gel de gelatina (6.67%) con nanovesículas encapsulando la fracción <1 kDa de túnica de calamar (P1)

	$L^*$	$a^*$	$b^*$
<b>G</b>	$20.16 \pm 0.41^a$	$-0.39 \pm 0.02^a$	$-1.24 \pm 0.08^a$
<b>L-P1</b>	$28.27 \pm 0.45^b$	$-2.22 \pm 0.42^b$	$-1.34 \pm 0.69^a$

$L^*$  = luminosidad;  $a^*$  = verde – rojo;  $b^*$  = amarillo – azul

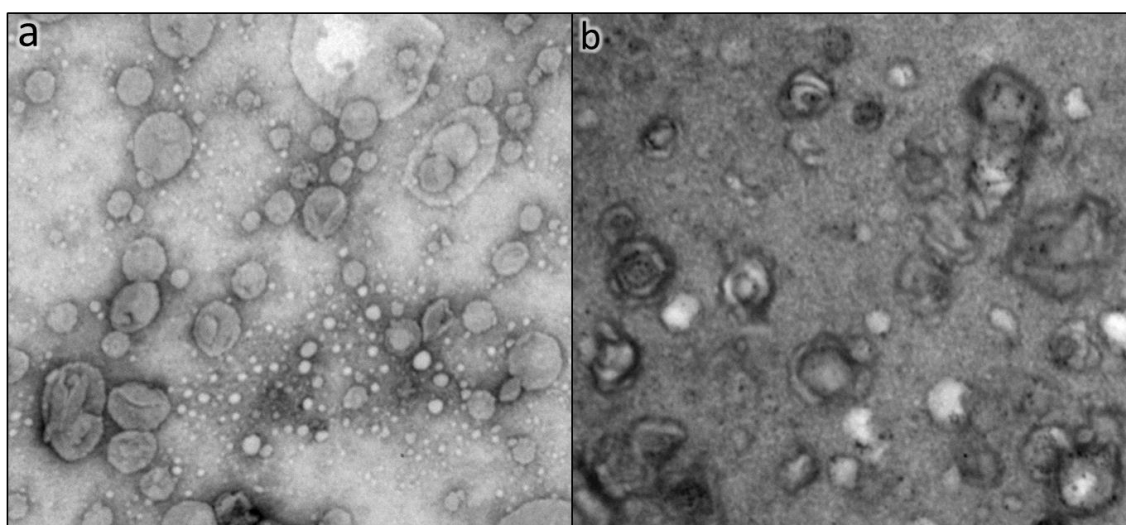
La actividad inhibidora de la ACE de P1 se mantuvo constante tras su encapsulación y la incorporación de las nanocápsulas en el gel de gelatina, indicando que el proceso no afecta a la actividad de la fracción peptídica, sino por el contrario, ayuda a proteger la actividad de P1 al protegerla en una doble matriz nanocápsula lipídica–gelatina.

La concentración de P1 necesaria para inhibir el 50% de la actividad de la ACE ( $IC_{50}$ ) fue de 96  $\mu\text{g/mL}$ . Cuando se incorporó la fracción de péptido encapsulado (L-P1) en la solución de gelatina, el valor de  $IC_{50}$ , calculado por  $\mu\text{g}$  de péptidos, fue 91  $\mu\text{g/mL}$ , sin verse afectada de manera significativa la actividad inhibidora de la ACE de la fracción peptídica y permitiendo a la fracción peptídica preservar las actividades biológicas en el gel. Con el fin de evaluar el potencial efecto antihipertensivo del gel con L-P1, se calculó el  $IC_{50}$  tomando en cuenta los sólidos totales y el contenido en agua del mismo, y se determinó un valor de  $50.8 \pm 4.8 \text{ mg/mL}$ . Teniendo en cuenta que el  $IC_{50}$  del Enalapril© es 2.7  $\mu\text{g/mL}$  (Alemán *et al.*, 2011c) y que esta droga es comercializada en presentaciones de 2.5, 5, 10 y 20 mg, se necesitaría una dosis de 94 g del gel de gelatina con L-P1 para emular una dosis de 5 mg de Enalapril©.

### 7.3.2. Nanoliposomas en películas comestibles de caseinato sódico

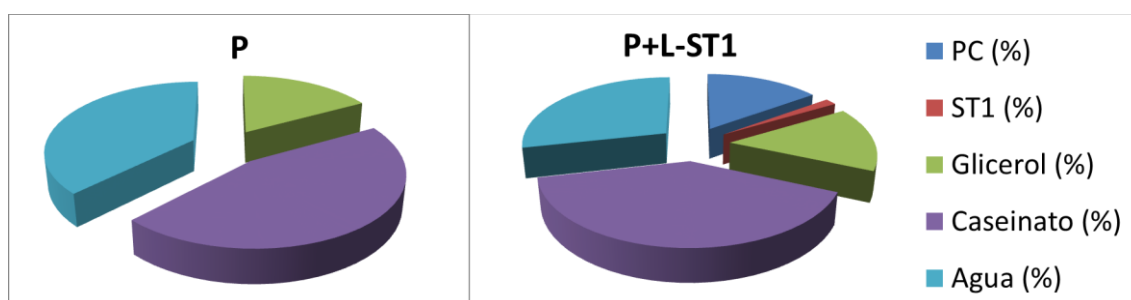
Para la segunda aplicación, de uso alimentario, la fracción peptídica < 1kDa del hidrolizado de langostinos (L-ST1), con actividad hipoglucemiante, se encapsuló en nanoliposomas, que fueron incorporados a películas comestibles elaboradas con caseinato de sodio.

Se elaboraron además películas con liposomas vacíos con el fin de comparar las diferencias en el comportamiento entre ambas películas.



**Figura 49.** Nanovesículas encapsulando la fracción peptídica ST1. a: liposomas antes de incorporarlos en las películas de caseinato sódico. b: liposomas luego de la incorporación en las películas.

Las películas con liposomas se analizaron mediante microscopía electrónica, donde, aunque se pudieron ver ligeras diferencias en la forma de las nanovesículas, todas ellas permanecieron íntegras en las películas, con un diámetro similar a las de antes de ser incorporadas a dichas películas (Figura 49). Los liposomas se distribuyeron de manera uniforme en la película, manteniendo su estructura y protegiendo a la fracción peptídica en una doble estructura (liposomas-estructura polimérica de caseinato de sodio). Al compararlas con películas de caseinato sódico sin nanovesículas, se pudo ver que al incorporar liposomas, el producto final presentaba un menor contenido de humedad (Figura 50) y una mayor solubilidad en agua.



**Figura 50.** Composición porcentual de las películas. PC: fosfatidilcolina; ST1: fracción < 3 kDa del hidrolizado de langostinos; P: película de caseinato de sodio; L: liposomas.

Aunque la película resultó más soluble en agua, en este caso no se puede considerar como un factor negativo, ya que este producto está diseñado para ser ingerido como alimento y se funda o deshaga en la boca. Según Souza *et al.* (2009), la solubilidad deseada en una película comestible depende de la función que se le quiera dar, así, películas menos solubles podrían utilizarse para proteger productos con alta actividad de agua, sin embargo películas altamente solubles en agua podrían servir incluso como dispositivos de transporte y absorción de compuestos bioactivos a nivel de la cavidad oral (Heinemann *et al.*, 2013).

Finalmente, muestras de películas comestibles (PL-ST1) fueron solubilizadas en agua y sometidas a calentamiento y agitación con el fin de disolverlas. El producto solubilizado fue sometido a una separación por filtración en gel para determinar la cantidad de ST1 liberada. Mediante este proceso se pudo determinar que tras la solubilización de la película en agua, se liberaba un 48 % de ST1. Esta información junto a la obtenida tras analizar las imágenes de la microscopía electrónica, señalan a la incorporación de nanoliposomas conteniendo péptidos bioactivos en películas comestibles de caseína, como un buen método para la fabricación de un alimento potencialmente funcional, protegiendo a su vez a ST1 en una doble estructura, lo que posiblemente ayude a incrementar la eficacia de las bioactividades de esta fracción peptídica, al ingresar en el organismo.

### **7.3.3. Uso de los nanoliposomas en aplicaciones alimentarias con efectos potencialmente nutracéuticos.**

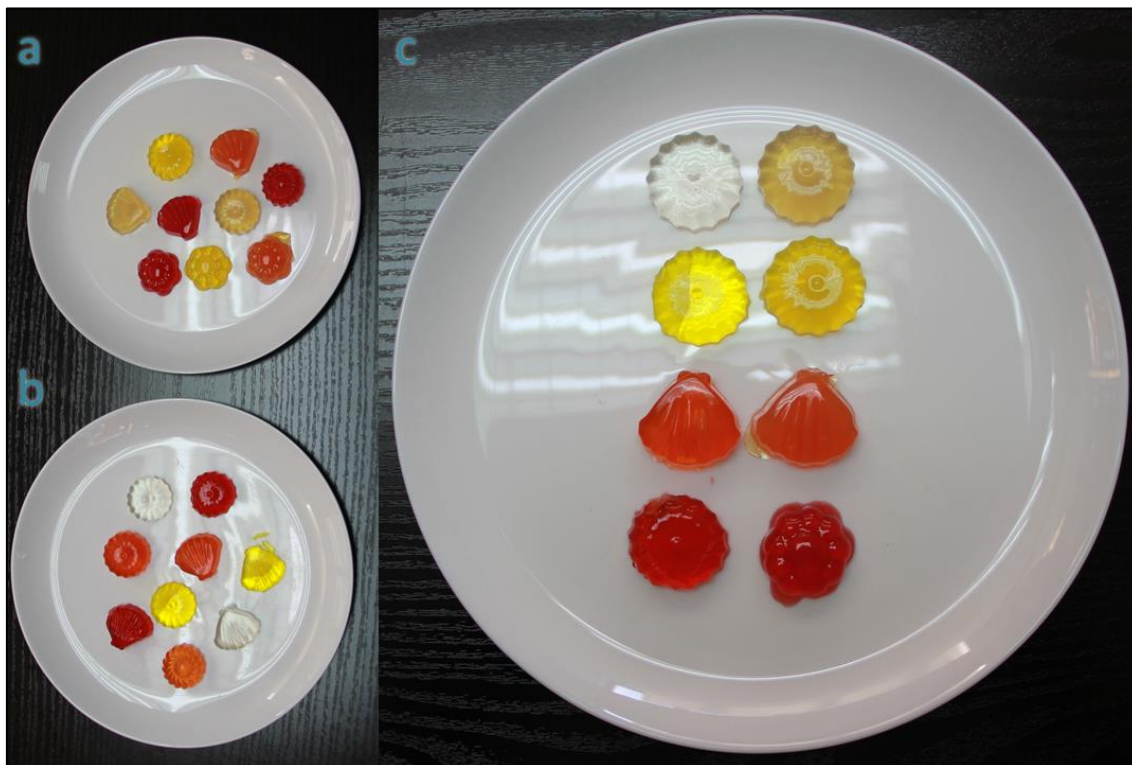
Como se analizó anteriormente, una dosis de 100 g de gelatina con L-P1 o una dosis de 9 g de película comestible con L-ST1 podrían aportar el mismo efecto que 5mg del antihipertensivo sintético Enalapril. Esta cantidad es la de un postre típico de gelatina o la utilizada para elaborar productos tipo áspic (Figura 51). No obstante el echo de utilizar una aplicación alimentaria tipo gel proteico da lugar a pensar que probablemente se puede extrapolar su inclusión en otros geles proteicos con efectos no muy diferentes debido a la gran estabilidad térmica y frente al pH de los liposomas.



Fuentes: a) <http://vivirsalud.imujer.com>; b) <http://www.theguardian.com>.

**Figura 51.** Ejemplos de productos elaborados con gelatina. a) gel de gelatina; b) áspic.

La Figura 52 muestra diferentes geles de gelatina con y sin liposomas, utilizando diferentes colorantes, como ejemplo de una aplicación alimentaria.



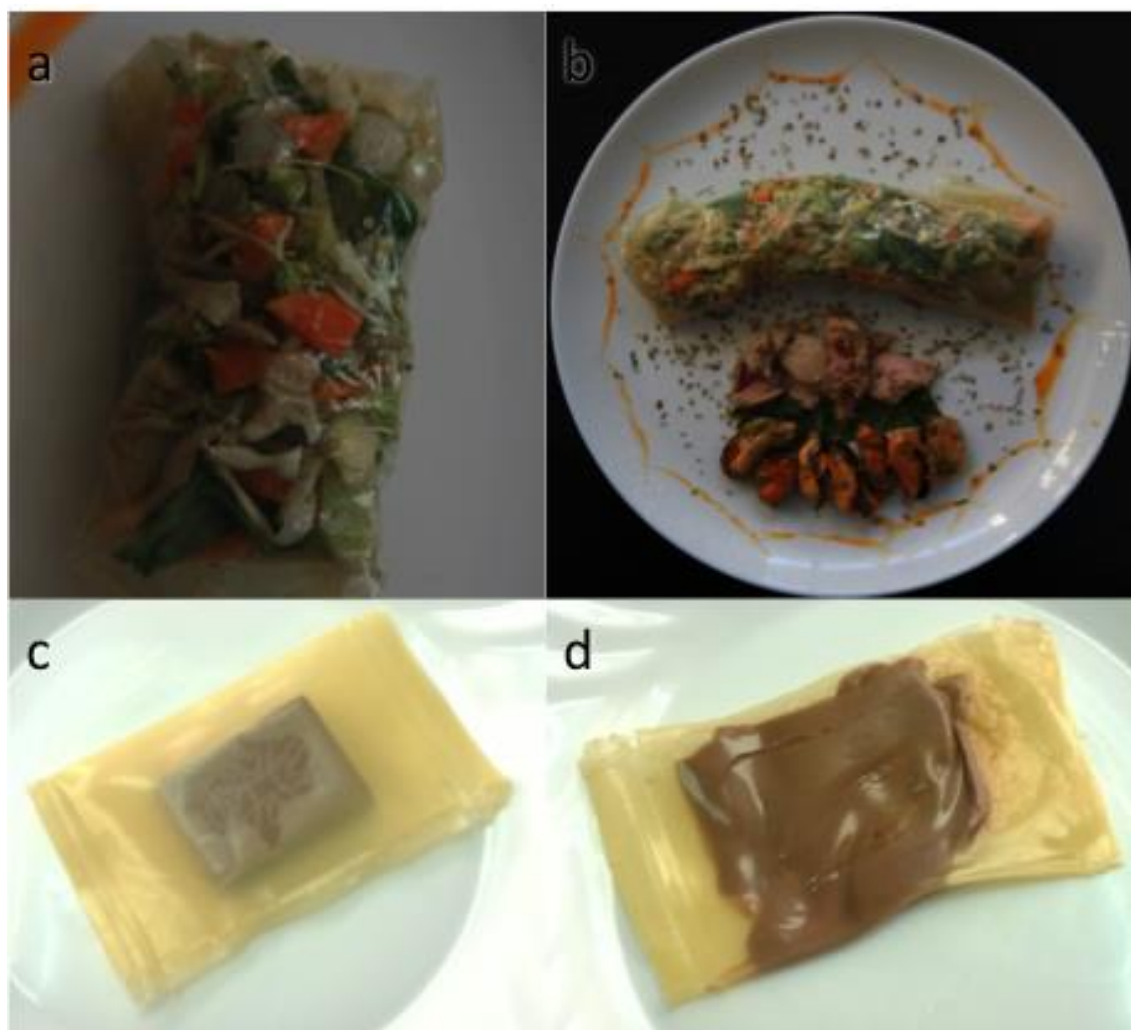
**Figura 52.** Geles de gelatina a) geles con liposomas; b) geles sin liposomas; c) geles de la fila izquierda no contienen liposomas; los de la fila de la derecha contienen liposomas.

Sin embargo, al encapsular por el método de calentamiento se pudo comprobar que es posible encapsular mayores cantidades de compuesto bioactivo (ST1), además los hidrolizados presentaron diferentes actividades, pudiendo encapsularse diferentes tipos de fracciones peptídicas, dependiendo de la actividad biológica que se quiera aportar al producto. En el presente estudio se utilizaron productos con una alta humedad y pH cercano a 7, lo que garantiza una mayor estabilidad de los liposomas en el tiempo, aunque también se pudo observar que los liposomas podían permanecer estables entre valores de pH entre 3 y 8. Esto abre un abanico de posibilidades al momento de pensar en nuevas aplicaciones de los liposomas en la industria.



En el caso de las películas comestibles con liposomas (Apartado 6.5) las mismas pueden ser consumidas de muy diferentes formas.

Con objeto de ver como se comportaba la película con un alimento en su interior, a modo de ejemplo se envolvieron vegetales con la película (Figura 53 a y b). También se envasó una porción de chocolate en la película con liposomas (L-ST1) y se calentó en microondas como tratamiento culinario, observando que el chocolate fundió y la película se mantuvo íntegra por lo que puede aplicarse en preparaciones culinarias de este tipo (Figura 53 c y d).



**Figura 53.** Ejemplo de aplicaciones para la película con L-ST1

Las películas elaboradas en el presente estudio fueron muy finas, buscando una mayor dificultad en la incorporación de cápsulas en ella. Sin embargo, las aplicaciones pueden ser múltiples, y entre ellas destacar como sustitutivas o análogas a las “pastas” ya sean versión asiática o italiana. Así por ejemplo para elaborar unos tortellinis, raviolis o fettuccinis, el grosor de las películas debe ser muy superior. Este tipo de producto sería interesante ya que son de origen proteico, fáciles de manipular en tratamientos culinarios y además la cantidad de liposomas que admiten es muy superior por lo que se podría llegar a introducir incluso la cantidad diaria adecuada que emule el efecto de los hipoglucemiantes sintéticos.



## **CONCLUSIONES**



1. Se obtuvieron péptidos inferiores a 3 kDa con actividad biológica a partir de residuos de la pesca (túnica de calamar, escamas de dorada y langostinos enteros sin valor comercial), todos ellos con un equilibrio entre aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos y relativamente alto contenido en Pro, Gly y Ala.
2. Es factible obtener hidrolizados con actividad biológica a partir de túnica de calamar y escamas de dorada (materiales ricos en colágeno) sin necesidad de realizar una extracción previa de gelatina.
3. La actividad antihipertensiva fue similar en las fracciones <1 kDa de túnica de calamar, escama de dorada y langostino.
4. La actividad hipoglucemiante fue dos veces más elevada en la fracción <1kDa de túnica de calamar y escamas de dorada que en la fracción < 3 kDa de langostino.
5. La actividad antioxidante fue similar en la fracción <1 kDa de túnica de calamar y langostino y 3 veces menor en la fracción <3 kDa de escamas de dorada.
6. La actividad antimicrobiana solo se evidenció en las fracciones 3-1 kDa y <1 kDa en túnicas de calamar.
7. Se encapsularon las fracciones peptídicas en nanoliposomas de fosfatidilcolina con una alta eficiencia, baja polidispersidad y alta estabilidad en un rango amplio de pH (3-7), permitiendo su aplicación en una gran variedad de sistemas alimentarios.
8. Los liposomas con péptidos fueron incorporados en un gel de gelatina sin perjuicio de las propiedades reológicas y térmicas del gel, confiriendo propiedades potencialmente nutraceuticas.
9. Los liposomas con péptidos fueron incorporados de manera uniforme en películas comestibles de caseinato sódico, manteniendo su estructura y aportando propiedades potencialmente nutraceuticas (hipoglucemiantes

y antihipertensivas), quedando los péptidos protegidos mediante la doble estructura liposoma-película.

## **CONCLUSIÓN GENERAL**

Residuos procedentes de la industria pesquera pueden ser valorizados mediante la obtención de fracciones peptídicas con altas actividades biológicas, que pueden ser utilizadas en el desarrollo de productos nutracéuticos de nueva generación en la industria alimentaria, a través de estrategias como la nanoencapsulación.





## ***REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



- Aasen, I. M., Markussen, S., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L. & Naterstad, K., (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1-2), 35-43.
- Abugoch, J. L., Guarda, M. A., Pérez, R. L. M., & Paredes, G. M. P. (1999). Determinación de la composición químico-proximal y la formulación de un producto tipo gel jibia (*Dosidicus gigas*). *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 49(2), 156-161.
- Ahhmed, A. M., & Muguruma, M. (2010). A review of meat protein hydrolysates and hypertension. *Meat Science*, 86(1), 110-118.
- Ahmad, M., & Benjakul, S. (2011). Characteristics of gelatin from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) as influenced by acid pretreatment and extraction time. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 381-388.
- Aleixandre Artiñano, M. A., Miguel Castro, M. & Editorial Complutense, (2009). Péptidos antihipertensivos derivados de proteínas alimentarias., 130.
- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011a). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 407-413.
- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santín, E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011b). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125(2), 334-341.
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudín, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011c). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(4), 1044-1051.
- Alexander, M., Acero López, A., Fang, Y., & Corredig, M. (2012). Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 427-436.
- APROMAR, (2012). La acuicultura marina en España 2012., 32-35.
- Arias, A. (1980). Crecimiento, régimen alimentario y reproducción de la dorada (*Sparus aurata* L.) y del robalo (*Dicentrarchus labrax* L.) en los esteros de Cádiz. *Invest.Pesq*, 44(1), 59-83.
- Ariyoshi, Y. (1993). Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 4(5), 139-144.

- Arvanitoyannis, I. S., & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(4), 726-745.
- Atkinson, A. B., & Robertson, J. I. S. (1979). Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. *Lancet*, 2(8147), 836-839.
- Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos*. México: Pearson Educación.
- Baggio, L. L., & Drucker, D. J. (2007). Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132(6), 2131-2157.
- Benítez, R., Ibarz, A. & Pagan, J., (2008). Protein hydrolysates: Processes and applications. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227-236.
- Benjakul, S., & Morrissey, M. T. (1997). Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3423-3430.
- Bitounis, D., Fanciullino, R., Iliadis, A., & Ciccolini, J. (2012). Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept. *ISRN pharmaceutics*, 2012, 1-11.
- Blanco-Pascual, N., Fernández-Martín, F., & Montero, P. (2013). Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) myofibrillar protein concentrate for edible packaging films and storage stability. *LWT - Food Science and Technology*, (0).
- Boran, G., & Regenstein, J. M. (2010). Chapter 5 - Fish Gelatin. In Anonymous *Advances in Food and Nutrition Research*(pp. 119-143). Academic Press.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), 1198-1205.
- Brinckmann, J. (2005). Collagens at a glance. In Anonymous *Collagen*(pp. 1-6). Springer.
- Brodsky, B. & Persikov, A. V., (2005). Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 301-339.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
- Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray Jr., P. B., & Tack, B. F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International journal of antimicrobial agents*, 22(5), 465-478.

- Byun, H. -, & Kim, S. -. (2001). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*, 36(12), 1155-1162.
- Byun, H., Lee, J. K., Park, H. G., Jeon, J., & Kim, S. (2009). Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Process Biochemistry*, 44(8), 842-846.
- Cao, W., Zhang, C., Hong, P., & Ji, H. (2009). Optimising the free radical scavenging activity of shrimp protein hydrolysate produced with alcalase using response surface methodology. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(8), 1602-1608.
- Cao-Hoang, L., Chaine, A., Grégoire, L., & Waché, Y. (2010). Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food Microbiology*, 27(7), 940-944.
- Chacra, A. R. (2006). Efeito fisiológico das incretinas. *Johns Hopkins Advanced Studies in Medicine*, 6(7B), 613-617.
- Chen, H. -, Muramoto, K., & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(3), 574-578.
- Chen, H. -, Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 49-53.
- Cheng, F. -, Wan, T. -, Liu, Y. -, Chen, C. -, Lin, L. -, & Sakata, R. (2009). Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase. *Animal Science Journal*, 80(1), 91-97.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., & Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 255(2), 401-407.
- Cheung, I. W. Y., & Li-Chan, E. C. Y. (2010). Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts investigated by Taguchi design. *Food Chemistry*, 122(4), 1003-1012.
- Chirra, H. D., & Desai, T. A. (2012). Emerging microtechnologies for the development of oral drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(14), 1569-1578.

Choi, S. -, & Regenstein, J. M. (2000). Physicochemical and Sensory Characteristics of Fish Gelatin. *Journal of Food Science*, 65(2), 194-199.

Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., & Degraeve, P. (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, 19(10), 982-989.

Cinq-Mars, C. D., & Li-Chan, E. C. Y. (2007). Optimizing angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate using response surface methodology and ultrafiltration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9380-9388.

Cobb, B. F., Vanderzant, C., & Hyder, K. (1974). Effect of ice storage on the free amino acid contents of tails of white shrimp (*Penaeus setiferus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(6), 1052-1055.

Colas, J. -, Shi, W., Rao, V. S. N. M., Omri, A., Mozafari, M. R., & Singh, H. (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38(8), 841-847.

Contreras, M. d. M., Carrón, R., Montero, M. J., Ramos, M., & Recio, I. (2009). Novel casein-derived peptides with antihypertensive activity. *International Dairy Journal*, 19(10), 566-573.

Córdova-Murueta, J. H., & García-Carreño, F. L. (2002). Nutritive value of squid and hydrolyzed protein supplement in shrimp feed. *Aquaculture*, 210(1-4), 371-384.

Cudennec, B., Ravallec-Plé, R., Courois, E., & Fouchereau-Peron, M. (2008). Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry*, 111(4), 970-975.

da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., da Silveira, N. P. & Brandelli, A., (2010a). Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*, 27(1), 175-178.

da Silva Malheiros, P., Micheletto, Y. M. S., Silveira, N. P. d. & Brandelli, A., (2010b). Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43(4), 1198-1203.

da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Micheletto, Y. M. S., Da Silveira, N. P. & Brandelli, A., (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: Physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3545-3552.

Daoud, R. *et al.* (2005). New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. *Peptides*, 26(5), 713-719.

Dathe, M., & Wieprecht, T. (1999). Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1462(1–2), 71-87.

Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., & López-Fandiño, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of food protection*, 67(9), 1939-1944.

de Wolf, F. A. (2003). Chapter V Collagen and gelatin. In Anonymous *Progress in Biotechnology*(pp. 133-218). Elsevier.

Deacon, C. F., & Holst, J. J. (2006). Dipeptidyl peptidase IV inhibitors: A promising new therapeutic approach for the management of type 2 diabetes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(5–6), 831-844.

Degnan, A. J., Buyong, N., & Luchansky, J. B. (1993). Antilisterial activity of pediocin AcH in model food systems in the presence of an emulsifier or encapsulated within liposomes. *International journal of food microbiology*, 18(2), 127-138.

Desai, K. G. H., & Jin Park, H. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23(7), 1361-1394.

Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307.

Diniz, F. M., & Martin, A. M. (1996). Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 31(5), 419-426.

DiTizio, V., Ferguson, G. W., Mittelman, M. W., Khoury, A. E., Bruce, A. W., & DiCosmo, F. (1998). A liposomal hydrogel for the prevention of bacterial adhesion to catheters. *Biomaterials*, 19(20), 1877-1884.

DiTizio, V., Karlgard, C., Lilge, L., Khoury, A. E., Mittelman, M. W., & DiCosmo, F. (2000). Localized drug delivery using crosslinked gelatin gels containing liposomes: Factors influencing liposome stability and drug release. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(1), 96-106.

Duez, H., Cariou, B., & Staels, B. (2012). DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Biochemical pharmacology*, 83(7), 823-832.

Erdmann, K., Cheung, B. W. Y., & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(10), 643-654.



Eyre, D. R. (1980). Collagen: Molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science*, 207(4437), 1315-1322.

Fabra, M., Jiménez, A., Atarés, L., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Effect of fatty acids and beeswax addition on properties of sodium caseinate dispersions and films. *Biomacromolecules*, 10(6), 1500-1507.

Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H. C., Shigematsu, T., Kida, K., & Uemura, Y. (2004). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39(10), 1195-1200.

FAO (2013). Species Fact Sheets: *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758). <<http://www.fao.org/fishery/species/2384/en>>.

FAO (2012a). *The state of world fisheries and aquaculture 2012*. Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department.

FAO (2012b). Yearbook 2010: Fishery and Aquaculture Statistics.

FAO (2010). *Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of cephalopod species known to date*. Rome. Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 13-27.

FitzGerald, R. J., Murray, B. A., & Walsh, D. J. (2004). Hypotensive Peptides from Milk Proteins. *Journal of Nutrition*, 134(4), 980S-988S.

Friess, W. (1998). Collagen – biomaterial for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45(2), 113-136.

Friskén, B. J. (2001). Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Applied Optics*, 40(24), 4087-4091.

Fujita, H., Yokoyama, K., & Yoshikawa, M. (2000). Classification and antihypertensive activity of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins. *Journal of Food Science*, 65(4), 564-569.

Fujita, H., & Yoshikawa, M. (1999). LKPNM: A prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, 44(1-2), 123-127.

Gallego, M., Aristoy, M., & Toldrá, F. (2013). Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides generated in Spanish dry-cured ham. *Meat Science*, (0).

Gbogouri, G. A., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2004). Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Science*, 69(8), C615-C622.

- Gemili, S., Yemenicioğlu, A., & Altinkaya, S. A. (2010). Development of antioxidant food packaging materials with controlled release properties. *Journal of Food Engineering*, 96(3), 325-332.
- Gennadios, A., McHugh, T. H., Weller, C. L., & Krochta, J. M. (1994). Edible coatings and films based on proteins. *Edible Coatings and Films to Improve Food Quality*, 201-277.
- Georgieva, D. N., Stoeva, S., Voelter, W., Genov, N., & Betzel, C. (2001). Differences in the Specificities of the Highly Alkalophilic Proteinases Savinase and Esperase Imposed by Changes in the Rigidity and Geometry of the Substrate Binding Sites. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 387(2), 197-201.
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International journal of food sciences and nutrition*, 50(3), 213-224.
- Gildberg, A., & Stenberg, E. (2001). A new process for advanced utilisation of shrimp waste. *Process Biochemistry*, 36(8-9), 809-812.
- Gillett, R. (2010). Estudio mundial sobre las pesquerías del camarón. *FAO Documento Técnico de Pesca*, (475), 386.
- Giménez, B., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2012). Antioxidant Peptides from Marine Origin. In G. Cirilo & F. Iemma, *Antioxidant Polymers: Synthesis, Properties, and Applications* (pp. 203-257). Wiley.com.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009a). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976-983.
- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, M. P. (2009b). Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 585-592.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2005a). The role of salt washing of fish skins in chemical and rheological properties of gelatin extracted. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 951-957.
- Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2005b). Storage of dried fish skins on quality characteristics of extracted gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 958-963.
- Giménez, B., López de Lacey, A., Pérez-Santín, E., López-Caballero, M. E., & Montero, P. (2013). Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 264-271.

- Giménez, B., Turnay, J., Lizarbe, M. A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2005c). Use of lactic acid for extraction of fish skin gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 941-950.
- Gobbetti, M., Minervini, F., & Rizzello, C. G. (2004). Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *International Journal of Dairy Technology*, 57(2-3), 173-188.
- Goldburg, W. I. (1999). Dynamic light scattering. *American Journal of Physics*, 67(12), 1152-1160.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.
- Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Alemán, A., López de Lacey, A., Giménez, B., & Montero, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *Sea by-products as raw material: New ways of application*, 89-115.
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, 20(1), 3-16.
- Gómez-Guillén, M. C., Turnay, J., Fernández-Díaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., & Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16(1), 25-34.
- Gómez-Ruiz, J. A., Recio, I., & Belloque, J. (2004a). ACE-inhibitory activity and structural properties of peptide Asp-Lys-Ile-His-Pro [ $\beta$ -CN f (47-51)]. Study of the peptide forms synthesized by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6315-6319.
- Gómez-Ruiz, J. Á., Ramos, M., & Recio, I. (2004b). Identification and formation of angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheese by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 269-277.
- Gontard, N., Guilbert, S., & Cuq, J. (1992). Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. *Journal of Food Science*, 57(1), 190-195.
- Guerard, F., Sumaya-Martinez, M. T., Laroque, D., Chabeaud, A., & Dufossé, L. (2007). Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42(11), 1486-1491.

- Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D., & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 11(4-6), 1051-1059.
- Guilbert, S., Gontard, N., & Gorris, L. G. M. (1996). Prolongation of the Shelf-life of Perishable Food Products using Biodegradable Films and Coatings. *LWT - Food Science and Technology*, 29(1-2), 10-17.
- Guinea, J., & Fernandez, F. (1997). Effect of feeding frequency, feeding level and temperature on energy metabolism in *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 148(2-3), 125-142.
- Gumisiriza, R., Mshandete, A. M., Thomas, M. S., Rubindamayugi, F. K., & Kivaisi, A. K. (2009). Nile perch fish processing waste along Lake Victoria in East Africa: Auditing and characterization. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 3(1), 013-020.
- Guo, H., Kouzuma, Y., & Yonekura, M. (2009). Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry*, 113(1), 238-245.
- Gustafsson, J., Nordenswan, E., & Rosenholm, J. B. (2003). Effect of pH on the sedimentation,  $\zeta$ -potential, and rheology of anatase suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 212(2-3), 235-247.
- Hancock, R. E. W., & Patrzykat, A. (2002). Clinical development of cationic antimicrobial peptides: From natural to novel antibiotics. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, 2(1), 79-83.
- Hans, M. L., & Lowman, A. M. (2002). Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, 6(4), 319-327.
- Harada, O., Kuwata, M., & Yamamoto, T. (2007). Extraction of gelatin from sardine scales by pressurized hot water. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, 54.
- Harada, M., Fukasawa, K. M., Fukasawa, K., & Nagatsu, T. (1982). Inhibitory action of proline-containing peptides on Xaa-Pro-dipeptidylaminopeptidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 705(2), 288-290.
- Harris, P., Normand, V., & Norton, I. T. (2003). GELATIN. In Editor-in-Chief: Benjamin Caballero, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (pp. 2865-2871). Oxford: Academic Press.
- Harrison, J. M. (1985). Brownian Motion and Stochastic Flow Systems. *Applied Stochastic Models and Data Analysis*, 140.

Hatanaka, T., Inoue, Y., Arima, J., Kumagai, Y., Usuki, H., Kawakami, K., Kimura, M., & Mukaihara, T. (2012). Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chemistry*, 134(2), 797-802.

Hayes, M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Stanton, C. (2006). Casein-derived antimicrobial peptides generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied and Environmental Microbiology*, 2260, 2264.

He, H. -, Chen, X. -, Sun, C. -, Zhang, Y. -, & Zhou, B. -. (2006). Analysis of novel angiotensin-i-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *Journal of Peptide Science*, 12(11), 726-733.

Heinemann, R. J. B., Carvalho, R. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Orally disintegrating film (ODF) for delivery of probiotics in the oral cavity — Development of a novel product for oral health. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19(0), 227-232.

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.

Hjortkjaer, R. K., Stavnsbjerg, M., Pedersen, P. B., Heath, J., Wilson, J. A., Marshall, R. R., & Clements, J. (1993). Safety evaluation of esperase. *Food and Chemical Toxicology*, 31(12), 999-1011.

Holthuis, L. (1980). Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO species catalogue. Vol. 1. *FAO Fisheries Synopsis*, 125(1).

Honary, S., & Zahir, F. (2012). Effect of process factors on the properties of doxycycline nanovesicles. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(2), 169-175.

Hou, H. *et al.* (2009). The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice. *Food Chemistry*, 115(3), 945-950.

Hsu, K., Tung, Y., Huang, S., & Jao, C. (2013). Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity of Peptides in Porcine Skin Gelatin Hydrolysates. *BIOACTIVE FOOD PEPTIDES IN HEALTH AND DISEASE*, 205.

Hsu, K. -. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122(1), 42-48.

Hsu, K. -, Lu, G. -, & Jao, C. -. (2009). Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*). *Food Research International*, 42(5-6), 647-652.

- Huang, Y., Hsiao, P., & Chai, H. (2011). Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. *Ceramics International*, 37(6), 1825-1831.
- Iannacone, J., & Alvarino, L. (2009). Catastro de la fauna endoparasitaria de la pota *Dosidicus gigas* (Cephalopoda) en el norte del Perú. *Neotrop. Helminthol*, 3(2), 89-100.
- Ichimura, T., Yamanaka, A., Otsuka, T., Yamashita, E., & Maruyama, S. (2009). Antihypertensive effect of enzymatic hydrolysate of collagen and gly-pro in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(10), 2317-2319.
- Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., & Mann, S. (2003). Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *International journal of biological macromolecules*, 32(3-5), 199-204.
- Imran, M., Revol-Junelles, A. -, René, N., Jamshidian, M., Akhtar, M. J., Arab-Tehrany, E., Jacquot, M., & Desobry, S. (2012). Microstructure and physico-chemical evaluation of nano-emulsion-based antimicrobial peptides embedded in bioactive packaging films. *Food Hydrocolloids*, 29(2), 407-419.
- Iwai, K. *et al.*, (2005). Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6531-6536.
- Jackson, J. B. *et al.* (2001). Historical overfishing and the recent collapse of coastal ecosystems. *Science*, 293(5530), 629-637.
- Jang, A., & Lee, M. (2005). Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Science*, 69(4), 653-661.
- Jaturanpinyo, M., Harada, A., Yuan, X., & Kataoka, K. (2004). Preparation of Bionanoreactor Based on Core-Shell Structured Polyion Complex Micelles Entrapping Trypsin in the Core Cross-Linked with Glutaraldehyde. *Bioconjugate chemistry*, 15(2), 344-348.
- Je, J. -, Park, P. -, Kwon, J. Y., & Kim, S. -. (2004). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7842-7845.
- Je, J. -, Qian, Z. -, Byun, H. -, & Kim, S. -. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42(5), 840-846.

Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 491-511.

Jeon, Y. -, Byun, H. -, & Kim, S. -. (1999). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35(5), 471-478.

Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu.Rev.Anal.Chem.*, 1, 801-832.

Jeya Shakila, R., Jeevithan, E., Varatharajakumar, A., Jeyasekaran, G., & Sukumar, D. (2012). Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 30-36.

Jia, J., Zhou, Y., Lu, J., Chen, A., Li, Y., & Zheng, G. (2010). Enzymatic hydrolysis of alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(4), 635-640.

Johansson, H., Svartström, O., Phadnis, P., Engman, L., & Ott, M. K. (2010). Exploring a synthetic organoselenium compound for antioxidant pharmacotherapy-toxicity and effects on ROS-production. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 18(5), 1783-1788.

Jung, W. -, Mendis, E., Je, J. -, Park, P. -, Byeng, W. S., Hyung, C. K., Yang, K. C., & Kim, S. -. (2006a). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*, 94(1), 26-32.

Jung, W. -, Park, P. -, Byun, H. -, Moon, S. -. & Kim, S. -, (2005). Preparation of hoki (*Johnius belangerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*, 91(2), 333-340.

Jung, W., Karawita, R., Heo, S., Lee, B., Kim, S., & Jeon, Y. (2006b). Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 41(9), 2097-2100.

Karim, A. A., & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 563-576.

Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., & Muguruma, M. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of porcine skeletal muscle proteins following enzyme digestion. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(3), 417-424.

- Kelleher, K. (2005). *Discards in the world's marine fisheries: an update*. Food & Agriculture Org.
- Khantaphant, S., & Benjakul, S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 151(4), 410-419.
- Kharyeki, M. E., Rezaei, M., & Motamedzadegan, A. (2011). The effect of processing conditions on physico-chemical properties of whitecheek shark (*Carcharhinus dussumieri*) skin gelatin. *International Aquatic Research*, 3, 63-69.
- Kheadr, E. E., Vuillemand, J. -, & El Deeb, S. A. (2000). Accelerated Cheddar cheese ripening with encapsulated proteinases. *International Journal of Food Science and Technology*, 35(5), 483-495.
- Khwaldia, K., Banon, S., Desobry, S., & Hardy, J. (2004). Mechanical and barrier properties of sodium caseinate–anhydrous milk fat edible films. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(4), 403-411.
- Kim, S. -, Byun, H. -, Park, P. -, & Shahidi, F. (2001a). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(6), 2992-2997.
- Kim, S. -, Kim, Y. -, Byun, H. -, Nam, K. -, Joo, D. -, & Shahidi, F. (2001b). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1984-1989.
- Kim, S. -, Kim, Y. -, Byun, H. -, Park, P. -, & Ito, H. (2001c). Purification and Characterization of Antioxidative Peptides from Bovine Skin. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 34(3), 219-224.
- Kim, S., Ngo, D., & Vo, T. (2012). Chapter 16 - Marine Fish-Derived Bioactive Peptides as Potential Antihypertensive Agents. In Anonymous *Advances in Food and Nutrition Research*(pp. 249-260). Academic Press.
- Kolodziejska, I., Skierka, E., Sadowska, M., Kolodziejski, W., & Niecikowska, C. (2008). Effect of extracting time and temperature on yield of gelatin from different fish offal. *Food Chemistry*, 107(2), 700-706.
- Lacroix, I. M. E., & Li-Chan, E. C. Y. (2012). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 25(2), 97-102.
- Laridi, R., Kheadr, E. E., Benech, R. -, Vuillemand, J. C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13(4), 325-336.



Ledward, D. A. (1986). Gelation of gelatin. *Functional Properties of Food Macromolecules*, 171-201.

Lee, A. *et al.* (2010a). Use of hydrogenophaga pseudoflava penetration to quantitatively assess the impact of filtration parameters for 0.2-micrometer-pore-size filters. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(3), 695-700.

Lee, S. -. *et al.* (2010b). Purification and characterisation of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products. *Food Chemistry*, 123(2), 216-220.

Li, C., Zhong, Z., Wan, Q., Zhao, H., Gu, H., & Xiong, S. (2008). Preparation and thermal stability of collagen from scales of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *European Food Research and Technology*, 227(5), 1467-1473.

Li-Chan, E. C. Y., Hunag, S. -. , Jao, C. -. , Ho, K. -. , & Hsu, K. -. (2012a). Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973-978.

Li-Chan, E. C. Y., Hunag, S. -. , Jao, C. -. , Ho, K. -. , & Hsu, K. -. (2012b). Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973-978.

Lin, L., & Li, B. -. (2006). Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin. *Journal of the science of food and agriculture*, 86(14), 2290-2295.

Lin, L., Lv, S., & Li, B. (2012). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. *Food Chemistry*, 131(1), 225-230.

Liu, W., Li, G., Miao, Y., & Wu, X. (2009). Preparation and characterization of pepsin-solubilized type I collagen from the scales of snakehead (*Ophiocephalus argus*). *Journal of Food Biochemistry*, 33(1), 20-37.

López-Abarrategui, C. *et al.* (2012). Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie*, 94(4), 968-974.

López-Caballero, M. E., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2013). Valorization and integral use of seafood by-products. In J. Texeira & A. Vicente, *Engineering Aspects of Food Biotechnology*(pp. 367-413). CRC Press/Taylor & Francis.

Lowry, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265-275.

Maes, M., Scharpé, S., & De Meester, I. (2007). Dipeptidyl peptidase II (DPPII), a review. *Clinica Chimica Acta*, 380(1-2), 31-49.

- Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheirilomoom, A., Cleymand, F., & Linder, M. (2012). Influence of lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes encapsulating natural dipeptide antioxidant l-carnosine. *Food Chemistry*, 134(2), 632-640.
- Malheiros, P. d. S., Sant'Anna, V., Barbosa, M. d. S., Brandelli, A., & Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International journal of food microbiology*, 156(3), 272-277.
- Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., & Nasri, M. (2010). Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from *Bacillus cereus* SV1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 345-357.
- Marcuse, R. (1960). Antioxidative effect of amino-acids. *Nature*, 186(4728), 886-887.
- Markaida, U., & Sosa-Nishizaki, O. (2003). Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83(3), 507-522.
- Markaida, U., & Sosa-Nishizaki, O. (2001). Reproductive biology of jumbo squid *Dosidicus gigas* in the Gulf of California, 1995-1997. *Fisheries Research*, 54(1), 63-82.
- Martín-Belloso, O., Rojas-Graü, M. A., & Soliva-Fortuny, R. (2009). Delivery of flavor and active ingredients using edible films and coatings. In Anonymous *Edible films and coatings for food applications*(pp. 295-313). Springer.
- Matsuda, N., Koyama, Y. -, Hosaka, Y., Ueda, H., Watanabe, T., Araya, T., Irie, S., & Takehana, K. (2006). Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 52(3), 211-215.
- Matthew, S., Ross, C., Paul, V. J., & Luesch, H. (2008). Pompanopeptins A and B, new cyclic peptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya confervoides*. *Tetrahedron*, 64(18), 4081-4089.
- McIntosh, C. H. S., Demuth, H., Kim, S., Pospisilik, J. A., & Pederson, R. A. (2006). Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(5-6), 860-872.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1973-1977.

- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2007). Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6509-6514.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. -, & Kim, S. -. (2005a). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. -. (2005b). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 581-587.
- Mente, E., Coutteau, P., Houlihan, D., Davidson, I., & Sorgeloos, P. (2002). Protein turnover, amino acid profile and amino acid flux in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei*: effects of dietary protein source. *Journal of Experimental Biology*, 205(20), 3107-3122.
- Mentlein, R. (1999). Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regulatory peptides*, 85(1), 9-24.
- Mertins, O., Sebben, M., Schneider, P. H., Pohlmann, A. R., & Da Silveira, N. P. (2008). Characterization of soybean phosphatidylcholine purity by <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR. *Química Nova*, 31(7), 1856-1859.
- Messerli, F. H. (1999). Hypertension and sudden cardiac death. *American Journal of Hypertension*, 12(12 SUPPL. 1), 181S-188S.
- Michon, C., Cuvelier, G., & Launay, B. (1993). Concentration dependence of the critical viscoelastic properties of gelatin at the gel point. *Rheological Acta*, 32(1), 94-103.
- Miguel, M., Recio, I., Gómez-Ruiz, J. A., Ramos, M., & López-Fandiño, R. (2004). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of food protection*, 67(9), 1914-1920.
- Mishra, D., Mishra, P. K., Dubey, V., Nahar, M., Dabadghao, S., & Jain, N. K. (2008). Systemic and mucosal immune response induced by transcutaneous immunization using Hepatitis B surface antigen-loaded modified liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(4–5), 424-433.
- Mito, K., Fujii, M., Kuwahara, M., Matsumura, N., Shimizu, T., Sugano, S., & Karaki, H. (1996). Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from hemoglobin. *European journal of pharmacology*, 304(1-3), 93-98.

- Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H., & Maruyama, S. (1991). Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(5), 1313-1318.
- Mizuno, K., Hayashi, T., & Bächinger, H. P. (2003). Hydroxylation-induced Stabilization of the Collagen Triple Helix FURTHER CHARACTERIZATION OF PEPTIDES WITH 4 (R)-HYDROXYPROLINE IN THE Xaa POSITION. *Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 32373-32379.
- Mochida, T., Hira, T., & Hara, H. (2010). The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. *Endocrinology*, 151(7), 3095-3104.
- Moeller, E. H., Holst, B., Nielsen, L. H., Pedersen, P. S., & Østergaard, J. (2010). Stability, liposome interaction, and in vivo pharmacology of ghrelin in liposomal suspensions. *International journal of pharmaceutics*, 390(1), 13-18.
- Mor, Y., Shoemaker, C. F., & Rosenberg, M. (1999). Compressive Properties of Whey Protein Composite Gels Containing Fractionated Milkfat. *Journal of Food Science*, 64(6), 1078-1083.
- Morales, J., Montero, P., & Moral, A. (2000). Isolation and partial characterization of two types of muscle collagen in some cephalopods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2142-2148.
- Moskowitz, R. W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 30(2), 87-99.
- Mozafari, M., Reed, C., & Rostron, C. (2002). Development of non-toxic liposomal formulations for gene and drug delivery to the lung. *Technology and Health Care*, 10(3-4), 342-344.
- Mozafari, M. R. (2010). Nanoliposomes: preparation and analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 605, 29-50.
- Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: An overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10(4), 711-719.
- Mozafari, M. R., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008a). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18(4), 309-327.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. (2008b). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11(4), 833-844.
- Mufamadi, M. S., Pillay, V., Choonara, Y. E., Du Toit, L. C., Modi, G., Naidoo, D., & Ndesendo, V. M. (2011). A review on composite liposomal technologies for specialized drug delivery. *Journal of drug delivery*, 2011.

- Muguerza, B., Ramos, M., Sánchez, E., Manso, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., Delgado, M. A., & Recio, I. (2006). Antihypertensive activity of milk fermented by *Enterococcus faecalis* strains isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 16(1), 61-69.
- Müller, R. H., Jacobs, C., & Kayser, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 3-19.
- Murray, B. A., & FitzGerald, R. J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production. *Current pharmaceutical design*, 13(8), 773-791.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B., & Duodu, K. G. (2004). Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18(4), 581-592.
- Nagai, T., Nagashima, T., Abe, A., & Suzuki, N. (2006). Antioxidative activities and angiotensin I-converting enzyme inhibition of extracts prepared from chum salmon (*oncorhynchus keta*) cartilage and skin. *International Journal of Food Properties*, 9(4), 813-822.
- Nagayasu, A., SHIMOOKA, T., & KIWADA, H. (1995). Effect of Vesicle Size on in Viva Release of Daunorubicin from Hydrogenated Egg Phosphatidylcholine-Based Liposomes into Blood.
- Nagayasu, A., Uchiyama, K., & Kiwada, H. (1999). The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40(1-2), 75-87.
- Nam, K. A., You, S. G., & Kim, S. M. (2008). Molecular and physical characteristics of squid (*Todarodes pacificus*) skin collagens and biological properties of their enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 73(4), C249-C255.
- Nauck, M., Stöckmann, F., Ebert, R., & Creutzfeldt, W. (1986). Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 29(1), 46-52.
- Neklyudov, A. D., Ivankin, A. N., & Berdutina, A. V. (2000). Properties and Uses of Protein Hydrolysates (Review). *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya*, 36(5), 533-534.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2005). *Lehninger. Principios de bioquímica*. Barcelona, España: Omega (pp. 1264).
- Nigmatullin, C. M., Nesis, K. N., & Arkhipkin, A. I. (2001). A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae). *Fisheries Research*, 54(1), 9-19.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) (2013). **Enzyme Nomenclature**. <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcbtn/index.html#6>>.

Nomura, Y., Sakai, H., Ishii, Y., & Shirai, K. (1996). Preparation and some properties of type I collagen from fish scales. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60(12), 2092-2094.

Norman, A. W., & Litwack, G. (1997). Chapter 7 - Pancreatic Hormones: Insulin and Glucagon. In Anonymous *Hormones (Second Edition)*(pp. 193-227). San Diego: Academic Press.

Ogawa, M., Moody, M. W., Portier, R. J., Bell, J., Schexnayder, M. A., & Losso, J. N. (2003). Biochemical Properties of Black Drum and Sheepshead Seabream Skin Collagen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8088-8092.

Ogawa, M., Portier, R. J., Moody, M. W., Bell, J., Schexnayder, M. A., & Losso, J. N. (2004). Biochemical properties of bone and scale collagens isolated from the subtropical fish black drum (*Pogonia cromis*) and sheepshead seabream (*Archosargus probatocephalus*). *Food Chemistry*, 88(4), 495-501.

Oh, J., Wang, B., Field, P. D., & Aglan, H. A. (2004). Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *International Journal of Food Science & Technology*, 39(3), 287-294.

Ondetti, M. A., & Cushman, D. W. (1982). Enzymes of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Annual Review of Biochemistry*, Vol.51, 283-308.

Ondetti, M. A., Rubin, B., & Cushman, D. W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science*, 196(4288), 441-444.

Ottova, A., & Tien, H. T. (2005). The Lipid Bilayer Principle: A Historic Perspective and Some Highlights. In Anonymous *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*(pp. 1-76). Academic Press.

Palm, C., Jayamanne, M., Kjellander, M., & Hällbrink, M. (2007). Peptide degradation is a critical determinant for cell-penetrating peptide uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(7), 1769-1776.

Palm, C., Netzereab, S., & Hällbrink, M. (2006). Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides*, 27(7), 1710-1716.

Park, C. H., Kim, H. J., Kang, K. T., Park, J. W., & Kim, J. -. (2009). Fractionation and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of gelatin hydrolysates from by-products of Alaska pollock surimi. *Fisheries and Aquatic Science*, 12(2), 79-85.

Park, P. -, Jung, W. -, Nam, K. -, Shahidi, F., & Kim, S. -. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6), 651-656.

Pasupuleti, V. K., & Demain, A. L. (2010). *Protein hydrolysates in biotechnology*. Netherlands: Springer (pp. 229).

Patchett, A. A. *et al.* (1980). A new class of angiotensin converting enzyme inhibitors. *Nature*, 288(5788), 280-283.

Pati, F., Adhikari, B., & Dhara, S. (2010). Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. *Bioresource technology*, 101(10), 3737-3742.

Pecora, R. (2000). Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2(2), 123-131.

Pérez-Mateos, M., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 53-61.

Perrett, S., Golding, M., & Williams, W. P. (1991). A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications: Characterization of the liposomes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43(3), 154-161.

Picot, L. *et al.* (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(11), 1819-1826.

Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. J. (2008). ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chemistry*, 109(1), 104-112.

Pinnaduwege, P., & Bruce, B. D. (1996). In vitro interaction between a chloroplast transit peptide and chloroplast outer envelope lipids is sequence-specific and lipid class-dependent. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51), 32907-32915.

Power, O., Nongonierma, A., Jakeman, P., & Fitzgerald, R. (2013). Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1-13.

Qian, Z. -, Jung, W. -, & Kim, S. -. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource technology*, 99(6), 1690-1698.

Qu, W., Ma, H., Pan, Z., Luo, L., Wang, Z., & He, R. (2010). Preparation and antihypertensive activity of peptides from *Porphyra yezoensis*. *Food Chemistry*, 123(1), 14-20.

Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Aleixandre, A., & Recio, I. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17(1), 33-41.

Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. -, & Kim, S. -. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569.

Ramezani, M., Khoshhamdam, M., Dehshahri, A., & Malaekheh-Nikouei, B. (2009). The influence of size, lipid composition and bilayer fluidity of cationic liposomes on the transfection efficiency of nanolipoplexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72(1), 1-5.

Rao, D., Chawan, C., & Veeramachaneni, R. (1994). LIPOSOMAL ENCAPSULATION OF  $\beta$ -GALACTOSIDASE: COMPARISON OF TWO METHODS OF ENCAPSULATION AND IN VITRO LACTOSE DIGESTIBILITY. *Journal of Food Biochemistry*, 18(4), 239-251.

Ratnam, D. V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D. K., & Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113(3), 189-207.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: Premises and promises. *International journal of antimicrobial agents*, 24(6), 536-547.

Revilla, E., Maria, C. S., Miramontes, E., Bautista, J., García-Martínez, A., Cremades, O., Cert, R. & Parrado, J., (2009). Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. *Food Research International*, 42(3), 387-393.

Riaz, M. (1996). Liposomes preparation methods. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 19(1), 65-77.

Robles-Avila, E., Valdez-Covarrubias, M. A., Gámez-Corrales, R., Acedo-Carrillo, J. I., & Jiménez-Regalado, E. J. (2010). Microreología de polímeros asociativos multiuniones en solución acuosa. *Revista mexicana de física*, 56(2), 106-112.

Rojas-Graü, M. A., Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva-Fortuny, R. C., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., & Martín-Belloso, O. (2007). Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45(2), 254-264.



Roper, C. F. E., Sweeney, M. J., & Nauen, C. E. (1984). *FAO species catalogue. Vol.3. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries*. Rome, Italy: FAO (pp. 277).

Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., & Morimatsu, F. (2008). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9586-9591.

Saiga, A., Okumura, T., Makihara, T., Katsuta, S., Shimizu, T., Yamada, R., & Nishimura, T. (2003a). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1741-1745.

Saiga, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003b). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3661-3667.

Sakai, H., Sato, A., Takeoka, S., & Tsuchida, E. (2007). Rheological properties of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) suspended in a series of plasma-substitute solutions. *Langmuir*, 23(15), 8121-8128.

Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., & Juneja, L. R. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86(1), 99-103.

Samaranayaka, A. G. P., Kitts, D. D., & Li-Chan, E. C. Y. (2010). Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1535-1542.

Sampath Kumar, N. S., Nazeer, R. A., & Jaiganesh, R. (2011). Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. *Peptides*, 32(7), 1496-1501.

Schagger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, 166(2), 368-379.

Schou, M., Longares, A., Montesinos-Herrero, C., Monahan, F. J., O'Riordan, D., & O'Sullivan, M. (2005). Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping. *LWT - Food Science and Technology*, 38(6), 605-610.

Schultz, N., Metreveli, G., Franzreb, M., Frimmel, F. H., & Syldatk, C. (2008). Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilisation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66(1), 39-44.

- Shimoni, E. (2009). Chapter 23 - Nanotechnology for Foods: Delivery Systems. In Gustavo Barbosa-Cánovas; Alan Mortimer; David Lineback; Walter Spiess; Ken Buckle and Paul Colonna; *Global Issues in Food Science and Technology*(pp. 411-424). San Diego: Academic Press.
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 929.
- Sikorski, Z. E., & Borderias, J. A. (1995). Collagen in the muscles and skin of marine animals. In Anonymous *Seafood proteins*(pp. 58-70). Springer.
- Silva, R., Little, C., Ferreira, H., & Cavaco-Paulo, A. (2008). Incorporation of peptides in phospholipid aggregates using ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 15(6), 1026-1032.
- Šližytė, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M., & Rustad, T. (2009). Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, 44(6), 668-677.
- Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Casariego, A., Lima, A. M. P., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2009). Effect of moderate electric fields in the permeation properties of chitosan coatings. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2110-2115.
- Stainsby, G. (1987). Gelatin gels. *Advances in meat research. Collagen as food*, 4, 209-222.
- Subramanian, S., Ross, N. W., & MacKinnon, S. L. (2009). Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa* L. *Marine Biotechnology*, 11(6), 748-757.
- Suetsuna, K. (2000). Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. *Marine Biotechnology*, 2(1), 5-10.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., & Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(3), 128-131.
- Tabacova, S. A., & Kimmel, C. A. (2001). Enalapril: pharmacokinetic/dynamic inferences for comparative developmental toxicity : A review. *Reproductive Toxicology*, 15(5), 467-478.
- Taylor, T. M., Bruce, B. D., Weiss, J., & Davidson, P. M. (2008). *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition in vitro by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. *Journal of Food Safety*, 28(2), 183-197.
- Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(7-8), 587-605.

- Taylor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., & Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by  $\zeta$ -potential, vesicle size, and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2(1), 1-9.
- Teixeira, M. L., dos Santos, J., Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2008). Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), 49-53.
- Téllez, G. A., & Castaño, J. C. (2010). Péptidos antimicrobianos. *Infectio*, 14(1), 55-67.
- Thakur, G., Mitra, A., Basak, A., Rousseau, D., & Pal, K. (2010). Characterization of oil-in-water gelatin emulsion gels: Effect of homogenization time., 305-308.
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71-78.
- Theodore, A. E., & Kristinsson, H. G. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibition of fish protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolate. *Journal of the science of food and agriculture*, 87(12), 2353-2357.
- Thewissen, B. G., Pauly, A., Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2011). Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by wheat gliadin hydrolysates. *Food Chemistry*, 127(4), 1653-1658.
- Torres-Arreola, W., Pacheco-Aguilar, R., Sotelo-Mundo, R., Rouzaud-Sáñez, O., & Ezquerro-Brauer, J. (2008). Partial characterization of collagen from mantle, fin, and arms of jumbo squid (*Dosidicus gigas*). *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(2), 101-108.
- Torrie, G. M., & Valteau, J. P. (1986). Double layer structure at the interface between two immiscible electrolyte solutions. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 206(1-2), 69-79.
- Tulipano, G., Sibilia, V., Caroli, A. M., & Cocchi, D. (2011). Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors. *Peptides*, 32(4), 835-838.
- Turner, D. J. (2010). Worldwide Adherents of All Religions; Religion: Year In Review 2010. In: Encyclopædia Britannica Online Academic Edition. <br />. <<http://global.britannica.com/EBchecked/topic/1731588/Religion-Year-In-Review-2010/298437/Worldwide-Adherents-of-All-Religions>>.
- Ulrich, A. S. (2002). Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. *Bioscience reports*, 22(2), 129-150.

Umesh Kumar, U., Rajanna, K. C., & Saiprakash, P. K. (2011). A kinetic and mechanistic study of hydrolysis of thiamine pyrophosphate (Cocarboxylase) in aqueous buffer and micellar media. *International Journal of ChemTech Research*, 3(3), 1088-1095.

Vance, J. E. (2003). Molecular and Cell Biology of Phosphatidylserine and Phosphatidylethanolamine Metabolism. In Anonymous *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*(pp. 69-111). Academic Press.

Verma, P., Ram, A., Jha, A., Mishra, A., & Thakur, A. (2010). Phosphatidylcholine: a revolution in drug delivery technology. *Int J Pharm Sci Res*, 1(2), 1-12.

Vyas, S. P. *et al.* (2005). Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) for non-invasive topical genetic immunization against hepatitis B. *International journal of pharmaceutics*, 296(1–2), 80-86.

Wang, L., An, X., Yang, F., Xin, Z., Zhao, L., & Hu, Q. (2008). Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chemistry*, 108(2), 616-623.

Wang, Y., & Regenstein, J. M. (2009). Effect of EDTA, HCl, and Citric Acid on Ca Salt Removal from Asian (Silver) Carp Scales Prior to Gelatin Extraction. *Journal of Food Science*, 74(6), C426-C431.

Wangtueai, S., & Noomhorm, A. (2009a). Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida* spp.) scales. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 825-834.

Wangtueai, S., & Noomhorm, A. (2009b). Processing optimization and characterization of gelatin from lizardfish (*Saurida* spp.) scales. *LWT - Food Science and Technology*, 42(4), 825-834.

Wangtueai, S., Noomhorm, A., & Regenstein, J. M. (2010). Effect of Microbial Transglutaminase on Gel Properties and Film Characteristics of Gelatin from Lizardfish (*Saurida* spp.) Scales. *Journal of Food Science*, 75(9), C731-C739.

Weber, R. E., & Van Marrewijk, W. J. A. (1972). Free amino acids in the shrimp *crangon crangon* and their osmoregulatory significance. *Netherlands Journal of Sea Research*, 5(4), 391-415.

Were, L. M., Bruce, B., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2004). Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 67(5), 922-927.

Were, L. M., Bruce, B. D., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2003). Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8073-8079.

- Wieprecht, T., Dathe, M., Epand, R. M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L., & Bienert, M. (1997). Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochemistry*, 36(42), 12869-12880.
- Wilson, J., Hayes, M., & Carney, B. (2011). Angiotensin-I-converting enzyme and prolyl endopeptidase inhibitory peptides from natural sources with a focus on marine processing by-products. *Food Chemistry*, 129(2), 235-244.
- Wu, H. -, Chen, H. -, & Shiau, C. -. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9-10), 949-957.
- Wu, J., Aluko, R. E., & Muir, A. D. (2002). Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*, 950(1-2), 125-130.
- Wu, J., & Ding, X. (2001). Hypotensive and physiological effect of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from soy protein on spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 501-506.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2), 370-376.
- Yang, J. -, Ho, H. -, Chu, Y. -, & Chow, C. -. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*, 110(1), 128-136.
- Yang, S., Chen, J., Zhao, D., Han, D., & Chen, X. (2012). Comparative study on preparative methods of DC-Chol/DOPE liposomes and formulation optimization by determining encapsulation efficiency. *International journal of pharmaceutics*, 434(1-2), 155-160.
- Yazbeck, R., Howarth, G. S., & Abbott, C. A. (2009). Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? *Trends in pharmacological sciences*, 30(11), 600-607.
- Young, S., Wong, M., Tabata, Y., & Mikos, A. G. (2005). Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules. *Journal of Controlled Release*, 109(1), 256-274.
- Yust, M. M., Pedroche, J., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2003). Production of ace inhibitory peptides by digestion of chickpea legumin with alcalase. *Food Chemistry*, 81(3), 363-369.
- Zhang, C., Li, X., & Kim, S. (2012). Application of marine biomaterials for nutraceuticals and functional foods. *Food Science and Biotechnology*, 21(3), 625-631.

Zhang, F., Xu, S., & Wang, Z. (2011). Pre-treatment optimization and properties of gelatin from freshwater fish scales. *Food and Bioproducts Processing*, 89(3), 185-193.

Zhang, Y., Kouguchi, T., Shimizu, K., Sato, M., Takahata, Y., & Morimatsu, F. (2010). Chicken collagen hydrolysate reduces proinflammatory cytokine production in C57BL/6.KOR-ApoEsh1 mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 56(3), 208-210.

Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X., & Zeng, M. (2007). Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry*, 42(12), 1586-1591.

Zugarramurdi, A., Parín, M. A., & Lupin, H. M. (1998). *Ingeniería económica aplicada a la industria pesquera*. Roma, Italia: FAO.

Zweers, M. L. T., Grijpma, D. W., Engbers, G. H. M., & Feijen, J. (2003). The preparation of monodisperse biodegradable polyester nanoparticles with a controlled size. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 66B(2), 559-566.

Zylberberg, L., Bonaventure, J., Cohen-Solal, L., Hartmann, D. J., & Bereiter-Hahn, J. (1992). Organization and characterization of fibrillar collagens in fish scales in situ and in vitro. *Journal of cell science*, 103(1), 273-285.



## **RESUMEN AMPLIADO / EXTENDED ABSTRACT<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup>Este resumen ampliado se presenta en cumplimiento de las directrices de la normativa de desarrollo del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, que regula los estudios de doctorado en la Universidad Complutense de Madrid (BOUC nº 14, de 21 de diciembre de 2012) y de acuerdo con las especificaciones establecidas por la Comisión de Doctorado de la Universidad Complutense de Madrid.





## 10.1. Resumen ampliado

### 10.1.1. Introducción

La pesca y la acuicultura suministran aproximadamente 150 millones de toneladas de pescado a nivel mundial (FAO, 2012a). La industria dedicada al procesamiento de productos pesqueros genera una gran cantidad de desechos, tales como pieles, espinas, escamas, vísceras, cabezas y restos de músculo; desechos que dependiendo de la especie y el tipo de procesamiento pueden ser entre 30 y 50% del peso inicial (Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008; Gumisiriza *et al.*, 2009; Giménez *et al.*, 2012). Últimamente se han desarrollado diversas estrategias para utilizar los residuos de pescados y mariscos, obteniendo productos de alto valor comercial tales como colágeno y gelatina procedentes de pieles, espinas y escamas; productos reestructurados a partir de cortes de músculo; lípidos y proteínas principalmente a partir de vísceras; hidrolizados y péptidos bioactivos (Giménez *et al.*, 2012; López-Caballero *et al.*, 2013).

La obtención de hidrolizados proteicos a partir de residuos de distintas especies acuáticas ha sido un área que ha recibido considerable atención los últimos 15 años (Jeon *et al.*, 1999; Guérard *et al.*, 2001; Rajapakse *et al.*, 2005). Dichos hidrolizados constituyen una fuente importante de péptidos biológicamente activos. Éstos se encuentran encriptados en la secuencia proteica original, sin embargo pueden ser liberados durante el procesado de los alimentos, durante la digestión gastrointestinal o la fermentación. Una vez que son liberados, los péptidos bioactivos pueden afectar a numerosas funciones fisiológicas del organismo (Gómez-Guillén *et al.*, 2011).

Para la producción de estos hidrolizados y péptidos, se han utilizado una serie de proteasas comerciales, con el objetivo de obtener hidrolizados y péptidos con distintas actividades biológicas. (Kim *et al.*, 2001b; Mendis *et al.*, 2005b; Lin & Li, 2006; Yang *et al.*, 2008).

Hidrolizados y péptidos derivados de diversas fuentes proteicas han exhibido numerosas bioactividades como: actividad antioxidante, antihipertensiva mediante inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE), hipoglucemiante mediante inhibición de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), antimicrobiana, capacidad de unión a minerales, efecto reductor de lípidos, actividad inmunomoduladora y efectos beneficiosos sobre la piel, los huesos o las articulaciones (Jung *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006b; Hou *et al.*, 2009; Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Li-Chan *et al.*, 2012b)

El peso molecular promedio de hidrolizados de proteínas es uno de los factores más importantes que determina sus propiedades biológicas, por lo que las fracciones peptídicas de hidrolizados proteicos pueden variar en su eficacia para una determinada actividad biológica. Un sistema de ultrafiltración por membranas puede ser un método útil y ventajoso industrialmente para la obtención de fracciones peptídicas de un tamaño molecular deseado y una mayor actividad biológica, dependiendo de la composición del hidrolizado inicial y la actividad que se esté estudiando (Jeon *et al.*, 1999; Cinq-Mars & Li-Chan, 2007; Picot *et al.*, 2010). Este sistema ha sido aplicado con éxito en el fraccionamiento y la caracterización funcional de los hidrolizados de gelatina de túnica de calamar o cobia (Lin & Li, 2006; Yang *et al.*, 2008) y también como un primer paso en el aislamiento y purificación de péptidos bioactivos procedentes de colágeno y otras fuentes proteicas (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Saiga *et al.*, 2008; Gómez-Guillén *et al.*, 2010; López-Caballero *et al.*, 2013).

Estas actividades biológicas podrían ser una alternativa a diferentes medicamentos sintéticos ya que a diferencia de éstos, los hidrolizados peptídicos y péptidos por lo general carecen de efectos adversos en el organismo (Zhang, Li & Kim, 2012). Sin embargo, la incorporación directa de los péptidos en productos alimentarios plantea algunas dificultades, relacionadas principalmente con la falta de estabilidad de los péptidos por degradación proteolítica, por exposición a condiciones extremas de pH o temperatura, así como por su posible interacción con los componentes

alimentarios (cationes divalentes, lípidos, proteínas), pudiendo ver reducida su actividad biológica (Aasen *et al.*, 2003; Chollet *et al.*, 2008; Mozafari *et al.*, 2008). Además, el tracto gastrointestinal constituye una barrera para la absorción de los principios activos. El ambiente ácido del estómago, la diversidad de enzimas intestinales, las condiciones de flujo gastrointestinal y las diversas capas de tejido epitelial pueden reducir considerablemente la biodisponibilidad de los péptidos, por lo que también cobra gran interés el desarrollo de dispositivos basados en biopolímeros en combinación con la nanotecnología para vehiculizar los agentes activos facilitando una liberación controlada y dirigida (Chirra & Desai, 2012).

La encapsulación de sustancias en nanosistemas lipídicos es una técnica cada vez más estudiada, especialmente como vehículos para fármacos y compuestos bioactivos (Jesorka & Orwar, 2008). En la industria alimentaria, los liposomas han sido utilizados en la encapsulación de proteínas, enzimas, vitaminas, antioxidantes, minerales, saborizantes y diversos compuestos bioactivos, ya que protegen al compuesto encapsulado contra radicales libres, iones metálicos, pH, temperatura, enzimas entre otros factores químicos y ambientales (Rao *et al.*, 1994; Shimoni, 2009; Fathi *et al.*, 2012). La nanoencapsulación de compuestos funcionales puede aportar muchos beneficios a la industria alimentaria, y aunque existen innumerables investigaciones y productos orientados a la industria farmacéutica, cada vez son más las aplicaciones de esta tecnología en alimentos.

### **10.1.2. Objetivos**

El objetivo general de la tesis fue la producción de fracciones peptídicas con actividad biológica a partir de residuos pesqueros, su encapsulación en nanoliposomas y la incorporación de éstos en dos sistemas alimenticios (gel de gelatina y película de caseína).

Para el cumplimiento de este objetivo se desarrollaron los siguientes objetivos parciales:

1. Obtención, fraccionamiento y caracterización química de hidrolizados peptídicos procedentes de residuos de la industria pesquera, sin valor comercial.
2. Evaluación de la actividad biológica de las fracciones peptídicas: actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, actividad antihipertensiva por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE) y actividad hipoglucemiante por inhibición de la dipeptidil-peptidasa IV (DPP-IV).
3. Encapsulación de fracciones peptídicas en nanoliposomas de fosfatidilcolina, caracterización y estabilidad.
4. Incorporación de nanoliposomas con péptidos antihipertensivos en un sistema de gelatina de pescado. Evaluación de las propiedades reológicas y potencialmente antihipertensivas del gel.
5. Incorporación de nanoliposomas con péptidos hipoglucemiantes en una película comestible de caseína. Evaluación de las propiedades físico-químicas y potencialmente hipoglucemiantes de la película.

### 10.1.3. Resultados

#### 10.1.3.1. *Obtención de fracciones peptídicas con actividades biológicas a partir de subproductos de la pesca*

Para la obtención de fracciones peptídicas con actividades biológicas se escogieron cuatro residuos procedentes de la industria pesquera, todos ellos ricos en material proteico: túnica de calamar gigante, espinas de dorada, escamas de dorada y langostinos enteros de los cuales se escogieron aquellos que presentaron las mayores actividades y el proceso más eficiente.

Dado que en la mayoría de los trabajos publicados para la obtención de hidrolizados peptídicos a partir de subproductos de origen pesquero ricos en colágeno, como primer etapa se procede a realizar una extracción de gelatina (colágeno desnaturalizado) para facilitar la hidrólisis enzimática posterior. Se analizaron las espinas y escamas de dorada como fuente de gelatina y se estudió la actividad inhibidora de la angiotensina-I (ACE) del hidrolizado peptídico de gelatina de escamas. De las escamas se obtuvo un rendimiento de extracción de gelatina de 9.55%, mientras que la extracción de gelatina a partir de espinas fue inferior al descrito para gelatinas de otras especies (Jeya Shakila *et al.*, 2012), lo cual se atribuye a una ineficiencia en los tratamientos de desproteinización y desmineralización de las espinas. Por este motivo, se desestimó su estudio posterior como fuente de hidrolizados bioactivos.

Mediante hidrólisis enzimática se obtuvieron hidrolizados peptídicos a partir de túnica de calamar gigante, gelatina de escamas de dorada, escamas de dorada desmineralizadas y langostinos. Estos hidrolizados presentaron grados de hidrólisis (DH) entre 16 y 20%

Las fracciones peptídicas obtenidas fueron fraccionadas mediante ultrafiltración determinándose tamaños moleculares entre 750 y 1000 Da, a excepción de la fracción peptídica de langostino que presentó péptidos de 750 y 200 Da. Por otra parte, todas las fracciones obtenidas contenían entre 52 y 62% de aminoácidos hidrofóbicos.

En el presente trabajo se estudiaron las actividades antioxidante, antimicrobiana, antihipertensiva mediante inhibición de la ACE e hipoglucemiante mediante inhibición de la DPP-IV. Gran parte de las investigaciones acerca de estas actividades relacionan dichas actividades con el tamaño molecular de las fracciones peptídicas, coincidiendo en todos los casos que la mayor actividad se concentra en la fracción de menor tamaño molecular (Jeon *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2007; Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Li-Chan *et al.*, 2012a), Este efecto fue confirmado en el segundo estudio del presente trabajo, donde las mayores actividades antihipertensiva, antimicrobiana y antioxidante coincidieron en las fracciones de menor tamaño molecular.

Con respecto a las actividades biológicas, las fracciones obtenidas a partir de escamas y gelatina de escamas de dorada presentaron una capacidad secuestrante de radicales libres ABTS de  $27.74 \pm 0.2$  y  $24.1 \pm 0.3$  mg VCEAC/g respectivamente, siendo esta actividad muy inferior a la encontrada en el resto de fracciones estudiadas, que presentaron valores entre 58 y 75 mg VCEAC/g. La mayor actividad antioxidante encontrada fue en la fracción <1 kDa obtenida mediante hidrólisis con Alcalasa.

La concentración de las diferentes fracciones obtenidas a partir de los hidrolizados de túnica de calamar, necesarias para inhibir el 50% de la actividad de la ACE ( $IC_{50}$ ) fue entre 50 y 100  $\mu$ g /mL viéndose los mejores resultados en la fracción de túnica de calamar liofilizada y en la fracción de gelatina y escamas desmineralizadas de dorada, siendo la actividad igual en estos dos últimos casos.

Con respecto a la actividad antimicrobiana, solo las fracciones procedentes de túnica de calamar presentaron actividad antimicrobiana. De las 26 cepas microbianas probadas, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Debaryomyces hansenii* y *Pseudomonas fluorescens* fueron las que presentaron mayor sensibilidad a las fracciones peptídicas de túnica de calamar, siendo la fracción

más eficaz en la inhibición del crecimiento de los microorganismos la de 1-3 kDa obtenida con Esperasa, que inhibió 20 de las 26 cepas microbianas.

La actividad hipoglucemiante, (actividad inhibidora de la DPP-IV) se determinó en las fracciones peptídicas procedentes de escamas de dorada, langostinos y túnica se calamar desecada (<1 kDa). Las fracciones peptídicas procedentes de materiales ricos en colágeno presentaron el doble de actividad inhibidora que la fracción obtenida de la hidrólisis de langostinos enteros (0.23 y 0.46 mg/mL respectivamente).

#### 10.1.3.2. *Encapsulación de hidrolizados peptídicos en nanoliposomas de fosfatidilcolina*

Para la encapsulación de las fracciones peptídicas en nanoliposomas de fosfatidilcolina (PC) se utilizaron las fracciones peptídicas procedentes de escamas de dorada, langostinos y túnica se calamar desecada (<1 kDa).

Las suspensiones obtenidas fueron caracterizadas tomando en cuenta los siguientes parámetros: el tamaño medio de los liposomas, el índice de polidispersidad, la eficiencia de encapsulación y el potencial zeta.

Los **tamaños de los liposomas** obtenidos presentaron ligeras diferencias entre sí, siendo el diámetro medio de los mismos de alrededor de 100 nm. Resultados similares se han descrito para liposomas fabricados con PC encapsulando péptidos (Were *et al.*, 2003; da Silva Malheiros *et al.*, 2011). De igual manera, el índice de polidispersidad fue similar en todos los casos, determinándose valores entre 0.19 y 0.25. Se ha descrito que para sistemas preparados a partir de materiales biológicos, es esperable encontrar valores de polidispersidad en un rango entre 0.2 y 0.3 (da Silva Malheiros *et al.*, 2011).

Las eficiencias de encapsulación fueron de 52, 53 y 74% para las fracciones de langostino, túnicas de calamar y escamas de dorada respectivamente. La mayor eficiencia de encapsulación encontrada en la fracción de escamas de dorada ésta posiblemente ligada a la mayor concentración de aminoácidos hidrofóbicos de la fracción peptídica. Según Riaz (1996) las eficiencias de



encapsulación de compuestos hidrofóbicos son usualmente elevadas, independientemente de la composición lipídica o tipo de liposoma.

La estabilidad de los liposomas se determinó mediante el potencial zeta de las dispersiones. Los diferentes suspensiones obtenidas mostraron ser muy estables, ya que presentaron valores entre -40 y -60 mV. Según Müller *et al.* (2001) un potencial zeta de  $\pm 30$  mV es el requerido para conseguir una nanosuspensión físicamente estable, estabilizada únicamente mediante repulsión electrostática.

#### *10.1.3.3. Aplicaciones tecnológicas de los encapsulados*

Con el fin de incorporar los nanoliposomas en sistemas alimentarios para poder ofertarlo como un alimento nutraceutico. Se utilizaron los liposomas encapsulando la fracción peptídica de túnica de calamar, con alta actividad antihipertensiva, para su inclusión en geles de gelatina. Al incorporar los liposomas en el gel de gelatina no se determinaron cambios negativos en las propiedades reológicas y térmicas del gel, además la actividad inhibidora de la ACE de la fracción peptídica se mantuvo constante tras su encapsulación y la incorporación de las nanocápsulas en el gel de gelatina, indicando que el proceso no afecta a la actividad de la fracción peptídica, sino por el contrario, ayuda a proteger la actividad de P1 al protegerla en una doble matriz (nanocápsula lipídica – gelatina).

La segunda aplicación tecnológica fue la incorporación de los liposomas encapsulando la fracción peptídica de langostinos, en películas comestibles de caseinato sódico. Las películas con liposomas se analizaron mediante microscopía electrónica donde, aunque se pudieron ver ligeras diferencias en la forma de los liposomas, los mismos permanecieron íntegros en las películas, con un diámetro similar a los liposomas antes de ser incorporados a las películas. Los liposomas se distribuyeron de manera uniforme en la película, manteniendo su estructura y protegiendo a la fracción peptídica en una doble estructura (liposomas-estructura polimérica de caseinato de sodio).



#### **10.1.4. Conclusiones**

1. Se obtuvieron péptidos inferiores a 3 kDa con actividad biológica a partir de residuos de la pesca (túnica de calamar, escamas de dorada y langostinos enteros sin valor comercial), todos ellos con un equilibrio entre aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos y relativamente alto contenido en Pro, Gly y Ala.
2. Es factible obtener hidrolizados con actividad biológica a partir de túnica de calamar y escamas de dorada (materiales ricos en colágeno) sin necesidad de realizar una extracción previa de gelatina.
3. La actividad antihipertensiva fue similar en las fracciones <1 kDa de túnica de calamar, escama de dorada y langostino.
4. La actividad hipoglucemiante fue dos veces más elevada en la fracción <1kDa de túnica de calamar y escamas de dorada que en la fracción < 3 kDa de langostino.
5. La actividad antioxidante fue similar en la fracción <1 kDa de túnica de calamar y langostino y 3 veces menor en la fracción <3 kDa de escamas de dorada.
6. La actividad antimicrobiana solo se evidenció en las fracciones 3-1 kDa y <1 kDa en túnicas de calamar.
7. Se encapsularon las fracciones peptídicas en nanoliposomas de fosfatidilcolina con una alta eficiencia, baja polidispersidad y alta estabilidad en un rango amplio de pH (3-7), permitiendo su aplicación en una gran variedad de sistemas alimentarios.
8. Los liposomas con péptidos fueron incorporados en un gel de gelatina sin perjuicio de las propiedades reológicas y térmicas del gel, confiriendo propiedades potencialmente nutraceuticas.

9. Los liposomas con péptidos fueron incorporados de manera uniforme en películas comestibles de caseinato sódico, manteniendo su estructura y aportando propiedades potencialmente nutraceuticas (hipoglucemiantes y antihipertensivas), quedando los péptidos protegidos mediante la doble estructura liposoma-película.

## **CONCLUSIÓN GENERAL**

Residuos procedentes de la industria pesquera pueden ser valorizados mediante la obtención de fracciones peptídicas con altas actividades biológicas, que pueden ser utilizadas en el desarrollo de productos nutraceuticos de nueva generación en la industria alimentaria, a través de estrategias como la nanoencapsulación



### 10.1.5. Referencias bibliográficas

Arvanitoyannis, I. S., & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(4), 726-745.

Cinq-Mars, C. D., & Li-Chan, E. C. Y. (2007). Optimizing angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate using response surface methodology and ultrafiltration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9380-9388.

Da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Micheletto, Y. M. S., Da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: Physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3545-3552.

FAO (2012). The state of world fisheries and aquaculture 2012. Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department.

Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 13-27.

Giménez, B., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2012). Antioxidant Peptides from Marine Origin. In G. Cirilo & F. Iemma, *Antioxidant Polymers: Synthesis, Properties, and Applications*(pp. 203-257). Wiley. com.

Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.

Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Alemán, A., López de Lacey, A., Giménez, B., & Montero, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *Sea by-products as raw material: New ways of application*, 89-115.

Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D., & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 11(4-6), 1051-1059.

Gumisiriza, R., Mshandete, A. M., Thomas, M. S., Rubindamayugi, F. K., & Kivaisi, A. K. (2009). Nile perch fish processing waste along Lake Victoria in East Africa: Auditing and characterization. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 3(1), 013-020.

Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -

lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.

Hou, H. *et al.* (2009). The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice. *Food Chemistry*, 115(3), 945-950.

Jeon, Y. -, Byun, H. -, & Kim, S. -. (1999). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35(5), 471-478.

Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu.Rev.Anal.Chem.*, 1, 801-832.

Jeya Shakila, R., Jeevithan, E., Varatharajakumar, A., Jeyasekaran, G., & Sukumar, D. (2012). Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 30-36.

Jung, W. -, Park, P. -, Byun, H. -, Moon, S. -, & Kim, S. -. (2005). Preparation of hoki (*Johnius belangerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*, 91(2), 333-340.

Jung, W., Karawita, R., Heo, S., Lee, B., Kim, S., & Jeon, Y. (2006). Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 41(9), 2097-2100.

Kim, S. -, Kim, Y. -, Byun, H. -, Nam, K. -, Joo, D. -, & Shahidi, F. (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1984-1989.

Li-Chan, E. C. Y., Hunag, S. -, Jao, C. -, Ho, K. -, & Hsu, K. -. (2012a). Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973-978.

Li-Chan, E. C. Y., Hunag, S. -, Jao, C. -, Ho, K. -, & Hsu, K. -. (2012b). Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973-978.

Lin, L., & Li, B. -. (2006). Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin. *Journal of the science of food and agriculture*, 86(14), 2290-2295.

López-Caballero, M. E., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2013). Valorization and integral use of seafood by-products. In J. Texeira & A. Vicente, *Engineering Aspects of Food Biotechnology*(pp. 367-413). CRC Press/Taylor & Francis.

- Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. -. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 581-587.
- Mozafari, M. R. (2010). Nanoliposomes: preparation and analysis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 605, 29-50.
- Müller, R. H., Jacobs, C., & Kayser, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 3-19.
- Park, P. -, Jung, W. -, Nam, K. -, Shahidi, F., & Kim, S. -. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6), 651-656.
- Picot, L. *et al.* (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(11), 1819-1826.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. -, & Kim, S. -. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569.
- Rao, D., Chawan, C., & Veeramachaneni, R. (1994). LIPOSOMAL ENCAPSULATION OF  $\beta$  - GALACTOSIDASE: COMPARISON OF TWO METHODS OF ENCAPSULATION AND IN VITRO LACTOSE DIGESTIBILITY. *Journal of Food Biochemistry*, 18(4), 239-251.
- Riaz, M. (1996). Liposomes preparation methods. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 19(1), 65-77.
- Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., & Morimatsu, F. (2008). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9586-9591.
- Shimoni, E. (2009). Chapter 23 - Nanotechnology for Foods: Delivery Systems. In Gustavo Barbosa-Cánovas A2Alan Mortimer A2David Lineback A2Walter Spiess A2Ken Buckle and Paul ColonnaA2 Gustavo Barbosa-Cánovas, Alan Mortimer, David Lineback, Walter Spiess, Ken Buckle & Paul Colonna, *Global Issues in Food Science and Technology*(pp. 411-424). San Diego: Academic Press.
- Were, L. M., Bruce, B. D., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2003). Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8073-8079.



Yang, J. -, Ho, H. -, Chu, Y. -, & Chow, C. -. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*, 110(1), 128-136.

Zhang, Y., Kouguchi, T., Shimizu, K., Sato, M., Takahata, Y., & Morimatsu, F. (2010). Chicken collagen hydrolysate reduces proinflammatory cytokine production in C57BL/6.KOR-ApoEsh1 mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 56(3), 208-210.

Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X., & Zeng, M. (2007). Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry*, 42(12), 1586-1591.

## 10.2. Extended abstract

### 10.2.1. Introduction

Fishing and aquaculture supplied about 150 million tons of fish worldwide (FAO, 2012). The industry of seafood processing generates a lot of waste, such as skins, bones, scales, guts, heads and remains of muscle; waste depending on the species and type of processing can be between 30 and 50 % of initial weight (Arvanitoyannis & Kassaveti, 2008; Gumisiriza *et al*, 2009; Giménez *et al*, 2012). In the last years, different strategies for using seafood waste are emerging, obtaining products of high commercial value such as collagen and gelatin from skins, bones and scales; restructured products from muscle cuts, lipids and proteins mainly from viscera, hydrolysates and bioactive peptides (Giménez *et al*, 2012; López-Caballero *et al*, 2013).

The obtaining of protein hydrolysates from residues of aquatic species has received considerable attention in the last 15 years (Jeon *et al*, 1999; Guérard *et al*, 2001; Rajapakse *et al*, 2005). These hydrolysates are an important source of biologically active peptides. These are encrypted in the original protein sequence, but can be released during food processing, fermentation or during the gastrointestinal digestion. Once they are released, the bioactive peptides can affect many physiological functions (Gómez-Guillen *et al*, 2011).

For the production of hydrolysates and peptides a number of commercial proteases have been used, with the aim of obtaining different biological activities. (Kim *et al*, 2001b; Mendis *et al*, 2005b; Lin & Li, 2006; Yang *et al*, 2008).

Hydrolysates and peptides derived from various protein sources have exhibited numerous biological activities, such as antioxidant, antihypertensive by the inhibition of angiotensin-I converting enzyme (ACE), hypoglycemic by inhibition of dipeptidyl peptidase-IV enzyme (DPP-IV), antimicrobial, mineral binding, lipid-lowering effect, immunomodulatory activity and skin, bones and joints

beneficial effects(Jung *et al*, 2005; Jung *et al*, 2006b; Hou *et al*, 2009; Gómez-Guillén *et al*, 2010; Zhang *et al*, 2010; Li-Chan *et al*, 2012b).

The average molecular weight of the protein hydrolysate is one of the most important factors determining its biological properties. An ultrafiltration system can be a useful and industrially advantageous method for producing peptidic fractions with the desired molecular size and greater biological activity, depending on the hydrolyate composition and the studied activity (Jeon *et al.*, 1999; Cinq-Mars & Li-Chan, 2007; Picot *et al*, 2010). This system has been successfully applied in the fractionation and functional characterization of gelatin hydrolysates from squid tunics or cobia skins (Lin & Li, 2006; Yang *et al*, 2008), and as a first step in the isolation and purification of bioactive peptides from collagen and other protein sources (Hernández-Ledesma *et al*, 2005; Zhao *et al*, 2007; Saiga *et al*, 2008; Gómez-Guillén *et al*, 2010; López-Caballero *et al*, 2013).

These peptides with biological activities could be an alternative to various synthetic drugs because unlike them, peptidic hydrolysates and peptides usually have no adverse health effects (Zhang & Kim, 2012). However, the direct incorporation of peptides into food products may exhibit some difficulties, mainly related with the low stability of peptides by proteolytic degradation, exposure to extremes values of pH or temperature, as well as their possible interaction with food components (divalent cations, lipids, proteins), being able to reduced their biological activity (Aasen *et al*, 2003; Chollet *et al*, 2008; Mozafari *et al*, 2008). Moreover, the gastrointestinal could be a barrier to the absorption of some active ingredients. The stomach acid environment, the diversity of intestinal enzymes, gastrointestinal flow conditions and the various layers of epithelial tissue can significantly reduce the bioavailability of peptides, so it makes sense the development of devices based on biopolymers in combination with nanotechnology to transport active agents, facilitating a controlled and targeted release (Chirra & Desai, 2012).

The encapsulation of substances into nanoliposomes is a technique increasingly studied, especially as carriers for drugs and bioactive compounds (Jesorka & Orwar, 2008). In the food industry, liposomes have been used for the encapsulation of proteins, enzymes, vitamins, antioxidants, minerals, flavorings, and various bioactive compounds, as well as to protect the encapsulated compounds against free radicals, metal ions, pH, temperature, enzymes, among other chemical and environmental factors (Rao *et al*, 1994; Shimoni, 2009; Fathi *et al*, 2012). The nanoencapsulation of functional compounds can bring many benefits to the food industry, and in spite of the existing great current research oriented to the pharmaceutical area, the application of this technology in food products is becoming more important.

#### **10.2.2. Objectives**

The aim of this Thesis was the production of biologically active peptic fractions from fish waste, their encapsulation in nanoliposomes and incorporating these into two food systems (gelatin gel and sodium caseinate film).

To this end, the following partial objectives were considered

1. Obtaining, fractionation and chemical characterisation of peptidic hydrolysates from residues of the fishing industry, with no commercial value.
2. Assessment of the biological activity of peptidic fractions: antioxidant activity, antimicrobial activity, antihypertensive activity by the inhibition of angiotensin-I converting enzyme (ACE) and hypoglycemic activity by inhibition of dipeptidyl peptidase-IV enzyme (DPP-IV).
3. Encapsulation of peptidic fractions into phosphatidylcholine nanoliposomes, characterization and stability.
4. Incorporation of nanoliposomes with antihypertensive peptides in a fish gelatin system and evaluate the rheological properties of the gel and its potential antihypertensive activity.

5. Incorporation of nanoliposomes with hypoglycemic and antihypertensive peptides into an edible sodium caseinate film, and further evaluation of the physicochemical and potential functional properties of the film.

### 10.2.3. Results

#### 10.2.3.1. Obtaining of peptide fractions with biological activities from fish industry residues

To obtain peptide fractions with biological activities, four residues from the fishing industry, all rich in protein material, were chosen: giant squid tunics, gilthead sea bream bones and scales and whole shrimps. In the majority of studies about obtaining protein hydrolysates from fish collagen-rich byproducts, a first step consists in the extraction of gelatin (denatured collagen) to facilitate the subsequent enzymatic hydrolysis. Bones and scales were analyzed as a source of gelatin, and the angiotensin-I (ACE) inhibitory activity of the scales gelatin hydrolysate was studied. From scales, a yield of 9.55 % of gelatin was obtained, while the extraction yield from bones was inferior to that described for gelatins from other species (Jeya Shakila *et al.*, 2012 ), which is attributed to inefficient bone deproteinisation and demineralisation treatments. For this reason, bones gelatin was rejected for further studies as a source of bioactive hydrolysates.

With respect to biological activities, fractions obtained from demineralized scales and gelatin scales showed radical scavenging activity (ABTS) of  $27.74 \pm 0.2$  and  $24.1 \pm 0.3$  mg VCEAC/g respectively, being this activity lower than that found in the other tested fractions, with values between 58 and 75 mg VCEAC/g. The highest antioxidant activity was found in the <1 kDa fraction obtained from squid tunic by hydrolysis with Alcalase.

The concentration of the different fractions from squid tunic hydrolysates necessary to inhibit the 50 % of ACE activity ( $IC_{50}$ ) was between 50 and 100  $\mu$ g/mL, being the highest results found in the lyophilized squid tunic fraction, and in the gelatin and demineralized scales fractions, with similar activity in the latter two cases.

Regarding antimicrobial activity, only the fractions from squid tunic showed antimicrobial activity. Of the 26 microbial strains tested, *Bacillus cereus*, *Bacillus*

*coagulans*, *Pseudomonas fluorescens* and *Debaryomyces hansenii* were those that showed greater sensitivity to the squid tunics peptide fractions, being the most effective that of 1-3 kDa obtained with Esperase, which inhibited 20 of the 26 microbial strains tested.

The hypoglycemic activity was determined in the peptide fractions from demineralized scales, dried squid tunic (<1 kDa) and shrimps. The inhibitory activity of peptide fractions from collagen-rich material was two-fold higher than the fraction obtained from the shrimp hydrolysisate (0.23 and 0.46 mg/mL respectively).

Hydrolysates obtained from giant squid tunics, gelatin scales, demineralized scales and shrimps showed degrees of hydrolysis (DH) between 16 and 20 %.

The molecular sizes of the lowermost molecular weight peptide fractions were determined between 750 and 1000 Da, except the peptide fraction from shrimp that presented peptides of 750 and 200 Da. All fractions contained between 52 and 62% hydrophobic amino acids.

In this study the antioxidant, antimicrobial, antihypertensive activity, determined by the ACE inhibition, and hypoglycemic activity, determined by DPP-IV inhibition, were studied. Much of the researches on these activities relate them to the molecular size of peptides, coinciding in all cases that the major activity is concentrated in the fraction with the lower molecular size. This effect was confirmed in the second study of this work.

#### *10.2.3.2. Encapsulation of peptidic hydrolysates into phosphatidylcholine nanoliposomes*

For the encapsulation of the peptide fractions into nanoliposomes produced from phosphatidylcholine (PC) the lowermost molecular weight peptide fractions from scales, dried squid tunics and shrimps was used.

The suspensions of liposomes were characterised in terms of average size, polydispersity index, encapsulation efficiency and zeta potential.

The liposome sizes slightly differed, with an average diameter of about 100 nm in all cases). In the same way, the polydispersity index was similar in all cases, with values between 0.19 and 0.25.

The encapsulation efficiencies were 52, 53 and 74 % for fractions of shrimp, squid tunics and sea bream scales, respectively. The encapsulation efficiency was higher in the scales fraction, possibly linked to the higher concentration of hydrophobic amino acids.

The stability of liposomes was determined by the zeta potential of the dispersions. The suspensions obtained were shown to be very stable, with values between -40 and -60 mV.

#### *10.2.3.3. Technological applications of nanoliposomes*

In order to incorporate nanoliposomes into a food system and to offer it as a nutraceutical food, liposomes encapsulating the peptide fraction of squid tunics, with high antihypertensive activity, were incorporated into a gelatin gel. The added liposomes did not induce any detriment in the rheological and thermal properties of the gel. The ACE inhibitory activity of the peptide fraction remained constant after encapsulation and addition of the nanocapsules in the gelatin gel, indicating that the process helps to protect the peptides into a double matrix (lipid nanocapsule-gelatin) without affecting their active potential.

The second technological application was the incorporation of liposomes encapsulating the peptide fraction of shrimp, into a sodium caseinate edible film. The films, analyzed by electron microscopy showed slight differences in the shape of liposomes, which proved to remain intact and uniformly distributed in the film. Inside the film, the encapsulated peptides were thus protected in a double structure (liposomes-polymeric structure of sodium caseinate).



#### **10.2.4. Conclusions**

1. Peptide fractions (<3 kDa) were obtained from seafood waste (squid tunics, gilthead seabream scales and whole prawns with no commercial value), all of them with a balance between hydrophobic and hydrophilic amino acids and a relatively high content of Pro, Gly and Ala.
2. Is feasible to obtain hydrolysates with biological activity from giant squid tunic and seabream scales (collagen -rich materials ) without the need for prior extraction of gelatin.
3. The antihypertensive activity was similar in fractions <1 kDa from squid tunics, gilthead seabream scales and whole shrimps.
4. The hypoglycemic activity was twice in the fraction <1 kDa from squid tunic and gilthead seabream scales than in the fraction <3 kDa from shrimps.
5. The antioxidant activity was similar in the fraction <1 kDa from squid tunics and shrimps and 3 times lower in the fraction <3 kDa from gilthead seabream scales.
6. The antimicrobial activity was evident only in fractions 3-1 kDa and <1 kDa in giant squid tunics.
7. Peptide fractions were encapsulated in phosphatidylcholine nanoliposomes with high efficiency, uniform size and high stability in a wide pH range (3-7).
8. Liposomes with peptides were incorporated into gelatin gel without prejudice to the rheological and thermal properties of the gel and conferring potentially nutraceutical properties.
9. Liposomes with peptides were uniformly incorporated into edible films of sodium caseinate, which were protected by the double structure liposome-film while maintaining their structure and providing potentially nutraceutical properties.

## **GENERAL CONCLUSION**

Waste from the fishery industry can be recovered by obtaining peptide fractions with high biological activities, which can be used in the development of new generation nutraceutical products in the food industry, by strategies such as nanoencapsulation.

## 10.2.5. References

- Arvanitoyannis, I. S., & Kassaveti, A. (2008). Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(4), 726-745.
- Cinq-Mars, C. D., & Li-Chan, E. C. Y. (2007). Optimizing angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate using response surface methodology and ultrafiltration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(23), 9380-9388.
- Da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., Micheletto, Y. M. S., Da Silveira, N. P., & Brandelli, A. (2011). Nanovesicle encapsulation of antimicrobial peptide P34: Physicochemical characterization and mode of action on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3545-3552.
- FAO (2012). The state of world fisheries and aquaculture 2012. Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department.
- Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 13-27.
- Giménez, B., López-Caballero, M. E., Montero, M. P., & Gómez-Guillén, M. C. (2012). Antioxidant Peptides from Marine Origin. In G. Cirilo & F. Iemma, *Antioxidant Polymers: Synthesis, Properties, and Applications*(pp. 203-257). Wiley. com.
- Gómez-Guillen, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827.
- Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Alemán, A., López de Lacey, A., Giménez, B., & Montero, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *Sea by-products as raw material: New ways of application*, 89-115.
- Guérard, F., Dufossé, L., De La Broise, D., & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 11(4-6), 1051-1059.
- Gumisiriza, R., Mshandete, A. M., Thomas, M. S., Rubindamayugi, F. K., & Kivaisi, A. K. (2009). Nile perch fish processing waste along Lake Victoria in East Africa: Auditing and characterization. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 3(1), 013-020.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -

lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.

Hou, H. *et al.* (2009). The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation-induced skin photoaging in ICR mice. *Food Chemistry*, 115(3), 945-950.

Jeon, Y. -, Byun, H. -, & Kim, S. -. (1999). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35(5), 471-478.

Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu.Rev.Anal.Chem.*, 1, 801-832.

Jeya Shakila, R., Jeevithan, E., Varatharajakumar, A., Jeyasekaran, G., & Sukumar, D. (2012). Functional characterization of gelatin extracted from bones of red snapper and grouper in comparison with mammalian gelatin. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 30-36.

Jung, W. -, Park, P. -, Byun, H. -, Moon, S. -, & Kim, S. -. (2005). Preparation of hoki (*Johnius belangerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chemistry*, 91(2), 333-340.

Jung, W., Karawita, R., Heo, S., Lee, B., Kim, S., & Jeon, Y. (2006). Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 41(9), 2097-2100.

Kim, S. -, Kim, Y. -, Byun, H. -, Nam, K. -, Joo, D. -, & Shahidi, F. (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 1984-1989.

Li-Chan, E. C. Y., Hunag, S. -, Jao, C. -, Ho, K. -, & Hsu, K. -. (2012a). Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973-978.

Li-Chan, E. C. Y., Hunag, S. -, Jao, C. -, Ho, K. -, & Hsu, K. -. (2012b). Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 973-978.

Lin, L., & Li, B. -. (2006). Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin. *Journal of the science of food and agriculture*, 86(14), 2290-2295.

López-Caballero, M. E., Giménez, B., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2013). Valorization and integral use of seafood by-products. In J. Texeira & A. Vicente, *Engineering Aspects of Food Biotechnology*(pp. 367-413). CRC Press/Taylor & Francis.

Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. -. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 581-587.

Mozafari, M. R. (2010). Nanoliposomes: preparation and analysis. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 605, 29-50.

Müller, R. H., Jacobs, C., & Kayser, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 3-19.

Park, P. -, Jung, W. -, Nam, K. -, Shahidi, F., & Kim, S. -. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6), 651-656.

Picot, L. *et al.* (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(11), 1819-1826.

Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. -, & Kim, S. -. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569.

Rao, D., Chawan, C., & Veeramachaneni, R. (1994). LIPOSOMAL ENCAPSULATION OF  $\beta$  - GALACTOSIDASE: COMPARISON OF TWO METHODS OF ENCAPSULATION AND IN VITRO LACTOSE DIGESTIBILITY. *Journal of Food Biochemistry*, 18(4), 239-251.

Riaz, M. (1996). Liposomes preparation methods. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 19(1), 65-77.

Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., & Morimatsu, F. (2008). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9586-9591.

Shimoni, E. (2009). Chapter 23 - Nanotechnology for Foods: Delivery Systems. In Gustavo Barbosa-Cánovas A2Alan Mortimer A2David Lineback A2Walter Spiess A2Ken Buckle and Paul ColonnaA2 Gustavo Barbosa-Cánovas, Alan Mortimer, David Lineback, Walter Spiess, Ken Buckle & Paul Colonna, *Global Issues in Food Science and Technology*(pp. 411-424). San Diego: Academic Press.

Were, L. M., Bruce, B. D., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2003). Size, Stability, and Entrapment Efficiency of Phospholipid Nanocapsules Containing Polypeptide Antimicrobials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 8073-8079.

Yang, J. -, Ho, H. -, Chu, Y. -, & Chow, C. -. (2008). Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*, 110(1), 128-136.

Zhang, Y., Kouguchi, T., Shimizu, K., Sato, M., Takahata, Y., & Morimatsu, F. (2010). Chicken collagen hydrolysate reduces proinflammatory cytokine production in C57BL/6.KOR-ApoEsh1 mice. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 56(3), 208-210.

Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X., & Zeng, M. (2007). Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry*, 42(12), 1586-1591.